

GENEXPRESSION HUMANER β -DEFENSINE (HBD-1, -2), INTERLEUKINE(IL-6, -8)
UND VON CYCLOOXYGENASE-2 IN ODONTOBLASTEN-ÄHNLICHEN ZELLEN UND
GINGIVAEPITHELZELLEN NACH BAKTERIELLER STIMULATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Mariana Emilova Mintcheva

aus
Sofia/Bulgarien

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, M.S.
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 08.04.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des
Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Bonn
Direktor : Prof. Dr. Dr. Jepsen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	8
1.1 Einführung	8
1.2 Gewebe und Zellen der Zahnpulpa	9
1.3 Das Gingivaepithel	10
1.4 Zytokine	11
1.5 Defensine	12
1.5.1 β -Defensine	13
1.6 Kariesentstehung	14
1.6.1 <i>Streptococcus mutans</i>	14
1.7 <i>Escherichia coli</i>	16
1.8 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Versuchsaufbau	18
2.2 Material und Reagenzien	18
2.3 Probegewinnung oraler Gewebe	18
2.4 Kultur primärer Zellen	19
2.5 Bestimmung der Zellzahl und Bakterienzahl	20
2.6 Bakterielle Stimulation	21
2.7 Stimulation von Odontoblasten-ähnlichen Zellen und Gingivaepithelzellen mit <i>Streptococcus mutans</i> und <i>Escherichia coli</i>	22
2.7.1 RNA-Extraktion und cDNA Synthese	22
2.8 Real-Time-Polymerasekettenreaktion	23
2.9 Auswertung der quantitativen PCR	25

3. Ergebnisse	27
3.1 Optimierung der Real-Time-PCR	27
3.2 Quantitative Genexpressionsanalyse	28
3.2.1 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit <i>S. mutans</i>	28
3.2.2 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit säurebehandelten <i>S. mutans</i>	30
3.2.3 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit hitzebehandelten <i>S. mutans</i>	31
3.2.4 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit <i>E. coli</i>	32
3.2.5 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit säurebehandelten <i>E. coli</i>	34
3.2.6 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit hitzebehandelten <i>E. coli</i>	35
3.2.7 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit <i>S. mutans</i>	36
3.2.8 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit säurebehandelten <i>S. mutans</i>	37
3.2.9 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit hitzebehandelten <i>S. mutans</i>	39
3.2.10 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit <i>E.coli</i>	40
3.2.11 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit säurebehandelten <i>E. coli</i>	41
3.2.12 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit hitzebehandelten <i>E. coli</i>	42
3.3 Übersicht der Genexpression in Odontoblasten-ähnlichen Zellen	43
3.4 Übersicht der Genexpression in Gingivaepithelzellen	44

4. Diskussion	45
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis	58
7. Danksagung	68
8. Lebenslauf	69

Abkürzungsverzeichnis

α	=	alpha
Å	=	Ångström
Aqua dest.	=	destilliertes Wasser
β	=	beta
bp	=	Basenpaar
° C	=	Grad Celsius
cDNA	=	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	=	Kohlendioxid
Cox-2	=	Cyclooxygenase-2
cPLA ₂	=	zytosolische Phospholipase-2
C _t	=	Schwellenzyklus (threshold cycle)
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagles-Medium
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	=	Desoxynukleosidtriphosphat
DSPP	=	Dentinsialophosphoprotein
dT	=	Desoxythymine
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	Ethylendiamintetraacetat (ethylenediaminetetraacetate)
et al.	=	und Mitarbeiter (et alii)
Fa.	=	Firma
FCS	=	Fötales Kälberserum
h	=	Stunde
hBD-1	=	humanes β -Defensin-1
hBD-2	=	humanes β -Defensin-2
HNP-3	=	humanes neutrophiles Peptid-3 (human neutrophil peptide-3)
IFN- γ	=	Interferon-gamma
IL	=	Interleukin
kDa	=	Kilodalton
kg	=	Kilogramm

KGM	=	keratinocyte growth medium
LB-Medium	=	Luria-Bertani-Medium
Log.	=	Logarithmus
MgCl ₂	=	Magnesiumchlorid
min.	=	Minute
MIP-3α	=	Makrophagen inflammatorisches Peptid-3alpha
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mM	=	Millimolar
mRNA	=	Messenger-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NF-κB	=	Nuklearfaktor-kappa B
ng	=	Nanogramm
PBS	=	phosphate buffered saline
PCR	=	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	=	negativer dekadischer Log. der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	=	pikomol
rhBD-2	=	rekombinantes humanes β-Defensin-2
RNA	=	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	=	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT-PCR	=	Reverse Transkriptase Realtime-Polymerasekettenreaktion
sec	=	Sekunde/n
<i>S. mutans</i>	=	<i>Streptococcus mutans</i>
Θ	=	theta
t	=	Zeit
TBE	=	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF-α	=	Tumornekrosefaktor-alpha
U	=	enzymatische Einheit/-en (unit/-s)
μg	=	Mikrogramm
μl	=	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Einführung

Karies stellt die häufigste Erkrankung der Mundhöhle dar. Diese ist charakterisiert durch eine Demineralisation und Proteolyse der Zahnhartsubstanzen infolge bakterieller Säureeinwirkungen und kann unbehandelt zur vollständigen Zerstörung des Zahnes mit der Folge des Zahnverlustes führen (Roessner et al., 2004). In einer Studie von Donkersloot and Hoerman konnte bereits gezeigt werden, dass *Streptococcus mutans* sowohl für die Induktion als auch Progression der Karies verantwortlich ist und somit einen wichtigen ätiologischen Faktor darstellt (Donkersloot and Hoerman, 1974).

Im Zuge der Kariesprogression kommt es zunächst zu einer Diffusion von bakteriellen Stoffwechselprodukten und im nächsten Schritt zu einer Invasion der pathogenen Mikroorganismen in die Zahnpulpa. Der Pulpa–Dentin Komplex reagiert üblicherweise mit einer entzündlichen Reaktion (Izumi et al., 1995). Darüber hinaus besitzt das pulpale Gewebe die Möglichkeit, verschiedene Systeme des Immunsystems zu aktivieren, um sich vor dem bakteriellen Angriff zu schützen (Jontell et al., 1998). In mehreren Versuchsreihen konnte festgestellt werden, dass *S. mutans* die Expression von IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 induziert (Engels-Deutsch et al., 2003; Hahn et al., 2000).

Vergleichbare Reaktionen konnten für orale Epithelien gezeigt werden, die mit einer Vielzahl von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten in Kontakt kommen. Sie verfügen über unterschiedliche Mechanismen der Immunabwehr, um das Eindringen der Mikroorganismen zu verhindern, ohne dass klinische Anzeichen einer Entzündung auftreten (Lehrer, 2004).

Dabei handelt es sich unter anderem um die Eigenschaft oraler Epithelien, antimikrobielle Peptide zu synthetisieren. Diese können sowohl direkt Mikroorganismen angreifen als auch Zytokin–ähnliche Funktionen erfüllen, in dem sie das erworbene Immunsystem aktivieren (Schröder, 1999a).

Ähnlich der oralen Epithelien besitzt auch die Pulpa die Möglichkeit antimikrobielle Peptide zu synthetisieren, um sich vor einer bakteriellen Invasion zu schützen. Vor

kurzem konnte erstmals auch die Expression humaner β -Defensine in Zellen des pulpalen Gewebes nachweisen werden. Diese könnten eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunabwehr der Pulpa spielen (Dommisch et al., 2005a).

1.2 Gewebe und Zellen der Zahnpulpa

Die Pulpa wird von einer Grundsubstanz gebildet, die hauptsächlich aus Glykosaminglykanen bzw. Proteoglykanen besteht. In dieser Matrix sind zahlreiche Kollagenfasern, Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenzellen und charakteristische Zellen der Pulpa eingebettet. Diese charakteristischen Zellen sind neben den Odontoblasten auch Fibroblasten, Ersatzzellen und Abwehrzellen des Immunsystems. Die Odontoblasten synthetisieren Bausteine der organischen Dentinmatrix, welche anschließend mineralisiert werden und somit zu Dentin heranreifen. Hierbei wird zwischen der Bildung von Primärdentin mit formativem Charakter, der zeitlebens physiologischen Bildung von Sekundärdentin und der Bildung von Tertiärdentin, welches eine Abwehrfunktion erfüllt, unterschieden (Hellwig et al., 2003).

Bei einer bakteriellen Infektion reagiert das pulpale Gewebe jedoch nicht nur mit der Neubildung von Dentin, sondern ist auch vielmehr in der Lage eine Immunantwort zu initiieren. In Versuchsreihen mit Karies- verursachenden Bakterien, wie *S. mutans* konnte festgestellt werden, dass in Pulpazellen vermehrt Zytokine (IL-6 und IL-8), sowie Enzyme der Eicosanoidbiosynthese (Cox-2, cPLA₂) synthetisiert werden (Eberhard et al., 2005; Engels- Deutsch et al., 2003; Hahn et al., 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in Zellen der Zahnpulpa die m-RNA humaner β -Defensine präsent ist (Dommisch et al., 2007a; Dommisch et al., 2005a).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass Gemeinsamkeiten zwischen oralen Epithelien und Zellen der Zahnpulpa bestehen, obwohl sie unterschiedlicher embryonaler Herkunft sind.

Die Zähne entwickeln sich im Zuge einer wechselseitigen Induktion zwischen dem Ektoderm der Mundhöhle und dem darunterliegenden speziellem Mesenchym, das der Neuralleiste entstammt und als Ektomesenchym bezeichnet wird (Moll, 2002; Welsch, 2003). Da das Ektoderm maßgeblich an der Differenzierung der Odontoblasten beteiligt

ist, kann vermutet werden, dass dieses seine epithelialen Eigenschaften (hBD-Synthese) auf die Odontoblasten übertragen hat (Dale, 2003).

1.3 Das Gingivaepithel

Die oralen Epithelien stellen die Grenzfläche zwischen der Umwelt und dem Organismus dar und stehen in direktem Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten. Unter gesunden Bedingungen, treten dort trotzdem keine Infektionen auf. Es ist eine neuere Erkenntnis, dass orale Epithelien nicht nur eine physikalische Barriere darstellen, aufgrund ihrer zahlreichen Zell–Zell Interaktionen in Form von „Tight Junctions“, Desmosomen und Zonula adherens, sondern dass sie vielmehr in der Lage sind, aktiv auf die bakterielle Besiedelung zu reagieren. Diese Reaktion erfolgt durch das angeborene Immunsystem, welches für die Abwehr bakterieller, aber auch viraler Angriffe und Pilzinfektionen zuständig ist (Dale&Krisanaprakornkit, 2001; Dale, 2000; Schröder, 1999b). Die angeborenen Mechanismen bilden somit die erste Barriere gegen den Eintritt von Mikroorganismen an Grenzflächen wie Haut und Schleimhäuten.

Das Immunsystem setzt sich zusammen aus der angeborenen Immunabwehr („innate immunity“) und der erworbenen Immunabwehr („adaptive immunity“) und bietet dem Organismus Schutz vor Infektionen durch verschiedene Mikroorganismen (Janeway et al., 2002). Die erworbene Immunabwehr wird durch T- und B-Lymphozyten vermittelt, die in der Lage sind, gegen ein weites Spektrum von Antigenen zu reagieren. Das angeborene Immunsystem wird repräsentiert durch Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killer-Zellen, Mastzellen sowie Epithel- oder auch Endothelzellen. Diese Zellen erkennen auf molekularer Ebene potentielle Infektionen, da sie bakterielle Bestandteile (Peptidoglykanen oder Lipopolysacchariden) an membranständigen Rezeptoren wie z.B. Toll-Like-Rezeptoren binden können (Hornef et al., 2002).

Durch Toll-Like-Rezeptoren könnte vermutlich die Expression von Defensinen, proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1, -6, -12, und -18), sowie von Chemokinen (IL-8) und Eikosanoiden vermittelt werden (Löffler et al., 2007; Hornef et al., 2002). Antimikrobielle Peptide töten nicht nur direkt Mikroorganismen ab, sondern haben auch

chemotaktische Eigenschaften, indem sie dendritische Zellen, Makrophagen und T-Lymphozyten aktivieren und somit eine wertvolle Verbindung zum erworbenen Immunsystem schaffen können (Dale, 2003; Löffler et al., 2007).

1.4 Zytokine

Zytokine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 6-30 kDa und wirken als hormonähnliche Signalstoffe regulatorisch auf die Aktivität des humoralen und zellulären Immunsystems (Arai et al., 1990).

Unmittelbar im Anschluss an einen auslösenden Reiz werden diese meist de novo synthetisiert und entfalten ihre Wirkung parakrin, also zwischen benachbarten Zellen sowie autokrin. Zytokine lassen sich nach vielen verschiedenen Gesichtspunkten klassifizieren und umfassen die Gruppe der Wachstumsfaktoren, der Chemokine, Interleukine und Interferone. Als Wachstumsfaktoren beeinflussen Zytokine die Hämatopoese und Lymphopoese und regulieren die Entwicklung von Vorläuferzellen zu differenzierten Zelltypen. Außerdem wirken diese stimulierend auf die Zellproliferation (Doenecke et al., 2005; Löffler et al., 2007). Innerhalb der Gruppe der Interferone spielen Zytokine eine besondere Rolle bei der Immunabwehr von Virusinfektionen und bei der Apoptose. Darüber hinaus können diese auch wachstumshemmend wirken (Löffler et al., 2007). Chemokine sind Zytokine, welche chemotaktisch eher wirksam werden und über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und vermittelte Prozesse Einfluss auf Zellen nehmen können (Löffler et al., 2007). Als Interleukine besitzen Zytokine vielfältige Aufgaben in der Regulation der Immunabwehr, der Entzündungsreaktion, der Hämatopoese und der Apoptose (Löffler et al., 2007).

In der frühen Phase einer Infektion führt die Interaktion zwischen pathogen Keimen und Zellen der angeborenen Immunabwehr (neutrophile Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen) zu einer Induktion der Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 und des Chemokins IL-8 (Doenecke et al., 2005, Löffler et al., 2007).

Die Zytokine aktivieren Zellen der erworbenen Immunabwehr (Th1- und Th2-Zellen) und führen somit zur Ausbildung einer protektiven Immunantwort. Dieses Zusammenspiel ist

maßgeblich an der Ausbildung einer genetisch bedingten Resistenz beteiligt (Wilkie und Mallard, 1999). Zytokin-ähnliche Eigenschaften, im Sinne einer Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem, wurden auch bei Defensine festgestellt (Yang et al., 1999 und 2002).

1.5 Defensine

Defensine sind positiv geladene antimikrobielle Peptide mit einem Molekulargewicht von 3,5 bis 5 kDa (Hill et al., 1991). Diese gehören dem angeborenen Immunsystem an und spielen eine wichtige Rolle in den ersten Stadien einer Infektion (Ganz, 2003).

Die Expression von Defensinen wird unter anderem durch Toll-Like-Rezeptoren vermittelt (Bals et al., 2000; Hornef et al., 2002; Schröder et al., 2006; Wehkamp et al., 2005). Humane Defensine besitzen ein breites Wirkungsspektrum sowohl gegen grampositive und gramnegative Bakterien, als auch gegenüber Pilzen und einigen membranumgebenen Viren (Ganz und Weiss, 1997). Die antimikrobielle Aktivität basiert auf der Eigenschaft, Aggregate innerhalb der Bakterienmembran zu bilden, wobei Poren- bzw. spannungsabhängige Kanäle ausgebildet werden können. Diese führen zu einem osmotischen Schock und somit zur Abtötung des Bakteriums (Ganz, 2003; Hill et al., 1991; Schröder et al., 1999c). Ein anderer Wirkungsmechanismus besteht darin, dass Defensine an die Bakterienmembran binden und eine teppich-ähnliche Formation ausbilden. Diese wirkt als Opsonierung und dient der Aktivierung des erworbenen Immunsystems (Yang et al., 2002).

Defensine bestehen aus 28-44 Aminosäuren und bilden eine typische β -Faltblattstruktur aus, welche durch drei Disulfidbrücken zwischen den sechs Cysteinresten stabilisiert wird (Schröder, 1999a). Humane Defensine sind in zwei Subfamilien unterteilt, α - und β -Defensine (Schröder, 1999a). Diese α - und β -Defensine unterscheiden sich in der intramolekularen Anordnung ihrer Disulfidbrücken (Ganz, 2003).

α -Defensine werden vor allem in neutrophilen Granulozyten synthetisiert (Ganz, 2003), während β -Defensine in Epithelien (Lehrer, 2004) und kürzlich auch in Pulpazellen, entdeckt worden sind (Dommisch et al., 2005a).

1.5.1 β -Defensine

Beta-Defensine werden in Epithelien des Interstitiums, der Trachea, des Urogenitaltraktes, der Vagina, der Tonsillen, der Epithelien der Haut bzw. Schleimhaut, der Zunge, der Speicheldrüsen und in Keratinozyten des oralen Gewebes exprimiert (Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Dunsche et al., 2001 und 2002; Ganz, 2003; Islam et al., 2001; Krisanaprakornkit et al., 1998; Takahashio et al., 2001). Die Expression in Pulpazellen konnte 2005 nachgewiesen werden (Dommisch et al., 2005a).

Zurzeit sind vier humane β -Defensine isoliert worden hBD -1, -2 und die später entdeckten hBD-3 und -4 (Harder et al., 2001 und 1997; Krisanaprakornkit et al., 2000; Lehrer et al., 1999; Nicolas et al., 1995; Schröder, 1999b).

Das humane β -Defensin-1 (hBD-1) wurde erstmals aus dem dialysierten Hämofiltrat (Plasma) von Patienten mit fortgeschrittenen, entzündlichen Nierenerkrankungen isoliert (Bensch et al., 1995). HBD-1 wird nicht nur in dem Urogenitaltrakt konstitutiv exprimiert sondern auch in Speicheldrüsen und im oralen Gewebe. Dieses wirkt bakterizid gegen gramnegative Bakterien (Dale et al., 2001; Dunsche et al., 2001; Ganz et al., 1997; Harder et al., 1997; Krisanaprakornkit et al., 1998; Mathews et al., 1999; Sahasrabudhe et al., 2000).

Das humane β -Defensin-2 wurde erstmalig in der Epidermis von Psoriasis-Patienten entdeckt (Harder et al., 1997). Als Reaktion auf proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α oder Interleukin-1 β , wird hBD-2 von oralen Epithelien und Speicheldrüsen sezerniert. HBD-2 wirkt stark bakterizid gegenüber gramnegative Bakterien und *Candida albicans* sowie bakteriostatisch gegen grampositive Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* (Harder et al., 1997). Außerdem konnten unterschiedliche Genexpressionsraten von hBD-1 und -2, festgestellt werden, beim Vergleich von erkrankter und gesunder Gingiva (Dommisch et al., 2005b). Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von hBD-2 über den Proteinase-aktivierten Rezeptor-2 in Gingivaepithelzellen durch das parodontopathogene Bakterium *Porphyromonas gingivalis* stimuliert wird (Dommisch et al., 2007c).

Das humane β -Defensin-3 ist induzierbar und weist bakterizide Eigenschaften gegen grampositive und gramnegative Bakterien auf und ebenfalls gegen *Candida albicans* (Harder et al., 1997).

Neben antimikrobiellen Eigenschaften besitzen Defensine im Rahmen des angeborenen Immunsystems Zytokin-ähnliche und chemotaktische Funktionen (Lehrer, 2004; Niyonsaba et al., 2004; Yang et al., 1999 und 2000). Darüber hinaus stimulieren β -Defensine Epithelzellen zur Synthese von immunmodulatorischen Botenstoffen (IL-6,-10 und -18) (Niyonsaba et al., 2007) und haben positive Einflüsse auf ihre Migration und Proliferation (Niyosaba et al., 2007).

1.6 Kariesentstehung

Karies ist definiert als eine lokalisierte Erkrankung der Zahnhartgewebe, die durch das Zusammenwirken potenziell pathogener Mikroorganismen und potenziell pathogener ökologischer Faktoren entsteht (Hellweg, 2003).

Die von Miller im Jahre 1898 erstmals aufgestellte Theorie zur Kariesentstehung findet bis heute noch Gültigkeit. Demnach ist die Kariesentstehung auf Mikroorganismen zurückzuführen, die bei dem Abbau von kariogenen Substraten organische Säuren produzieren (Heidemann et al., 1999).

1.6.1 *Streptococcus mutans*

S. mutans gehört zu der Gattung der *Streptokokken* und zeigt bei Verwendung von Blutagar β -hämolisierende Eigenschaften. Es handelt sich um ein grampositives, fakultativ anaerobes Bakterium, welches als fakultativ pathogener Erreger für die Endocarditis lenta und Karies gilt (Hahn et al., 2005). Clarke gelang es im Jahre 1924, *S. mutans* aus kariösen Kavitäten im Mundraum zu isolieren. Bis zu diesem Zeitpunkt waren nur runde Streptokokken bekannt, so dass Clarke aufgrund ihrer ovalen Form diese für Mutanten hielt. Dementsprechend bezeichnete er dieses Bakterium als: *Streptococcus mutans* (*S. mutans*).

Beim Menschen wird von ca. 700 im Mund befindlichen Bakterienspezies *S. mutans* am häufigsten (70-100%) angetroffen, wobei er nachweislich mit der Anzahl von kariösen Läsionen korreliert (Beighton et al., 1989; Buischi et al., 1989; Carlsson et al., 1985; Eisenberg et al., 1991; Hellden et al., 1989; Kristoffersson et al., 1985 und 1986; Loesche, 1982 und 1986; Salonen et al., 1989).

S. mutans verwertet Saccharose und trägt somit entscheidend zu einem lokalen Anstieg organischer Säuren wie Milchsäure und Brenztraubensäure bei. Wirken Säuren für eine längere Zeit auf den Zahnschmelz ein, führen diese zu einer Demineralisation der Zahnhartsubstanzen. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass *S. mutans* aufgrund seiner Stoffwechselleistungen eine herausragende Rolle bei der Kariesentstehung spielt. Im Jahre 1954 konnte Orland durch Experimente an keimfreien Ratten, die in bakteriendichten Isolatoren gezüchtet wurden zeigen, dass bei diesen Tieren, trotz einer kohlenhydratreichen Ernährung, keine Karies zu finden war. Bei den Tieren der Kontrollgruppe, die mit kariogenen Mikroorganismen kontaminiert waren, konnte dagegen im gleichen Zeitraum eine Entstehung kariöser Läsionen beobachtet werden (Orland et al. 1954). Fitzgerald und Keyes zeigten im Jahre 1960 in Tierversuchen mit Hamstern, dass es sich bei der Entstehung von Karies um eine spezifische Infektion mit *S. mutans* handelt (Fitzgerald und Keyes, 1960). Demnach gilt *S. mutans* als wichtigster Kariesauslöser. Die entsprechende Konzentration von *S. mutans* korreliert mit einem erhöhten Kariesrisiko (Hirsch, 1999).

Doch *S. mutans* wird nicht nur mit der Kariesentstehung in Verbindung gebracht. Neuere Studien zeigten, dass dieser Keim zu einer verstärkten Expression von IL-6 und IL-8 in Pulpazellen führt. Damit übernimmt er auch eine wichtige Rolle in der Entstehung von Entzündungsreaktionen, die je nach Grad der Induktion proinflammatorischer Zytokine in akuten oder chronischen Pulpitiden, münden können (Engels-Deutsch et al., 2003).

1.7 *Escherichia coli*

Die Spezies *Escherichia coli* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und vereinigt Stämme, die aufgrund besonderer Virulenzfaktoren als obligat pathogen gelten, aber auch Stämme die ubiquitär vorkommen und als fakultativ pathogen angesehen werden. Diese fakultativ pathogenen Stämme sind Bestandteil der physiologischen Darmflora und wurden 1885 von Theodor Escherich aus dem Stuhl von Kleinkindern isoliert. Es handelt sich dabei um gramnegative, peritrich begeißelte, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien von 2-4 µm Länge (Hahn et al., 2005).

Während *E. coli* im Darm als Bestandteil der habituellen Standortflora gilt, zählt er andererseits zu den häufigsten Erregern von Harnwegsinfektionen (bis zu 80%).

Durch den Zerfall der Bakterienzellen entstehen Enterotoxine wie Lipopolysaccharide (Lipid A), die bei allen gramnegativen Bakterien Bestandteil der äußeren Membran sind. Das Lipid A ist in diesem Zusammenhang verantwortlich für die toxischen Wirkungen und die Induktion von Entzündungsmediatoren (TNF- α , Interleukine). *E. coli* verfügt darüber hinaus über Hämine (Cytochrome und Katalase) und ist in der Lage, Energie sowohl durch Atmung, als auch durch gemischte Säuregärung (anaerob) zu gewinnen (Schlegel et al., 1992). Unter anaeroben Bedingungen führt *E. coli* eine gemischte Säuregärung durch, bei der drei Säuren in signifikanten Mengen gebildet werden: Essigsäure, Milchsäure und Bernsteinsäure (Madigan et al., 2006).

1.8 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Humane β -Defensine konnten in den vergangenen Jahren in allen epithelialen Geweben der Mundhöhle sowie im Speichel nachgewiesen werden (Dunsche et al., 2002; Mathews et al., 1999). Ebenfalls konnte vor kurzem die Expression der humanen β -Defensine-1 und -2 in der Odontoblastenzellschicht der gesunden Pulpa nachgewiesen werden (Dommisch et al., 2005a). Dies verleiht diesen Zellen im Rahmen des angeborenen Immunsystems epithelähnliche Eigenschaften (Dale und Krisanaprakornkit, 2001).

Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede in der Genexpression humaner β -Defensine (hBD-1, -2), Interleukin-6, Interleukin-8 und Cyclooxygenase-2 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen und Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit dem kariogenen Bakterium *S. mutans* im Vergleich zu dem nicht oralpathogenen Bakterium *E. coli* zu analysieren.

Von besonderem Interesse war es, Unterschiede im Expressionsprofil der oben aufgeführten Gene innerhalb der zwei Zelltypen nach bakterieller Stimulation zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Maßnahmen wurden kariesfreie Weisheitszähne sowie Biopsien der gesunden Gingiva gewonnen (2.3). Mit Hilfe dieser Gewebe wurden Odontoblasten-ähnliche Zellen und Gingivaepithelzellen kultiviert und mit *S. mutans* und *E. coli* stimuliert (2.6). Im Anschluss wurde die Genexpression humaner β -Defensine (hBD-1, -2), pro-inflammatorischer Mediatoren (IL-8, -6) sowie einem Enzym der Eikosanoid-Biosynthese (Cox-2) mit Hilfe der Real-Time PCR analysiert (2.9).

2.2 Material und Reagenzien

Die Kulturschalen und Zellschaber wurden von der Fa. Labomedic GmbH (Bonn) bezogen. Das Zellkulturmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagles-Medium), sowie die Antibiotika Penicillin, Amphotericin und Streptomycin waren von der Fa. PAA Laboratories GmbH (Cölbe), die Trypsin-EDTA-Lösung von der Fa. Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen), der Trypsininhibitor von der Fa. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und das CO₂ von der Fa. Linde (Höllriegelskreuth).

Die zur Aufbewahrung und Bearbeitung der gesammelten Proben benötigten Eppendorf-Tubes und Pipettenspitzen waren von der Fa. Sarstedt (Nümbrecht). Das verwendete Aqua dest. wurde von der Fa. Braun Melsungen AG (Melsungen) bezogen.

2.3 Probengewinnung oraler Gewebe

In die Untersuchungen wurden ausschließlich gesunde Patienten eingeschlossen, die sich aufgrund oralchirurgischer Indikationen zur Behandlung in der Poliklinik für

Chirurgische Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Direktor: Prof. Dr. G. Wahl) im Universitätsklinikum Bonn eingefunden hatten.

Im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Weisheitszahnextraktionen wurden Gewebeproben gewonnen und unmittelbar post operationem für die Zellkultur vorbereitet. Für die Untersuchung wurden ausschließlich kariesfreie Weisheitszähne verwendet. Alle Patienten wurden darüber aufgeklärt, dass mit ihrem Einverständnis zur Probenentnahme keine zusätzlichen Materialentnahmen verbunden seien.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn geprüft und genehmigt (Antrag Ethikkommission AZ.: 142/05).

2.4 Kultur primärer Zellen

Sofort nach der Extraktion wurden die Zähne für die Gewebekultivierung entsprechend dem beschriebenen Protokoll vorbereitet (Tjäderhane et al., 1998; Dommisch et al., 2007a und b; Veerayutthilai et al., 2007).

Die extrahierten, kariesfreien Zähne wurden mit sterilen Küretten von parodontalem Gewebe befreit. Um Kontaminationen durch bakteriell besiedelte Fissuren zu vermeiden, wurden diese mit einem Diamanten (Fa. Hager&Meisinger, Neuss) ausgefräst. Abschließend wurden die so vorbereiteten Zähne mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und perpendicular zu der Zahnachse, entlang der Schmelz-Zement-Grenze mit einem Diamantbohrer (Fa. Hager&Meisinger, Neuss), bis tief ins Dentin, kurz vor der Pulpahöhle, eingekerbt. Somit konnte unter der Sterilbank unter Zuhilfenahme eines Skalpells von der Fa. Aesculap (Tuttlingen) das Kronen- von dem Wurzelfragment getrennt werden. Daraufhin wurde das Pulpagewebe mit einer sterilen Pinzette entnommen und das Kronenfragment in das Kulturmedium plaziert.

Die Gewebeproben wurden aseptisch sofort nach der Entnahme in 4 ml Kulturmedium, bestehend aus DMEM, 10% FCS, Penicillin, Streptomycin und Amphotericin kultiviert.

Für die Anzucht von Odontoblasten-ähnlichen Zellen wurden die Kronenfragmente in 4 ml Kulturmedium eingebracht. Ziel dieser Prozedur war es, Zellen der Odontoblastenschicht, die direkt an das Dentin des Zahnes angrenzen, zu kultivieren.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37° C und 5% CO₂ in einem Inkubator der Fa. Thermo (Dreieich). Das Medium wurde in einem Drei-Tagesrhythmus gewechselt.

Die Anzucht einer Zellkultur aus Odontoblasten-ähnlichen Zellen benötigte ca. 4 Wochen. Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen in Kryoröhrchen von der Fa. Nalgene CRYOWARE™ (Nunc International, Rochester, NY, USA) bei -80° C eingefroren.

Für die Stimulation wurden primäre Zellen auf die Fähigkeit, hBDs zu exprimieren, verifiziert. Die Versuchsreihe erfolgte mit einer Zelllinie, bei der die Genexpression von hBDs nachgewiesen wurde.

Die Kultur der Gingivaepithelzellen wurde anhand etablierter Methoden durchgeführt (Dommisch et al., 2007c; Krisanaprakornkit et al., 1998). Dazu wurden Gingivabiopsien in KGM kultiviert. Die primären Zellen wurden ebenfalls mittels RT-PCR bezüglich einer hBD-Genexpression charakterisiert. Alle Stimulationsexperimente sind mit einer Zelllinie, bei der sich Transkripte von hBDs detektieren ließen, durchgeführt worden. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80%-90% in Keratinozytenwachstumsmedium (2%FCS, Penicillin, Streptomycin, Amphotericin) (Fa. PromoCell, Heidelberg) bei 37° C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert.

2.5 Bestimmung der Zellzahl und Bakterienzahl

Die Bakterienanzahl wurde mit einer Neubauerkammer bestimmt. Dazu wurde ein spezifisches Volumen der entsprechenden Bakteriensuspension mikroskopisch ausgezählt. Die Auszählung erfolgt unter Zuhilfenahme eines plangeschliffenen Objektträgers, in dem sich 16 eingetätzten Zählquadraten befinden. Die Kantenlänge eines Kleinquadrates beträgt 0,05 mm, seine Fläche 1/400 mm². Die Zählkammer wurde auf dem Objektträger plaziert und die Anzahl der Mikroorganismen pro Kleinquadrat ermittelt. Anschließend wurde der Mittelwert aller Ergebnisse errechnet. Die Konzentration bzw. Bakterienzahl wurde mit Hilfe folgender Gleichung ermittelt (Näveke und Trepper, 1979):

$$\text{Mikroorganismen-Konzentration (ml}^{-1}\text{)} = \text{Mikroorganismen je Kleinquadrat} \times 2 \times 10^7$$

In der vorliegenden Arbeit wurde 1 µl einer Bakterienkultur in 1 ml PBS gelöst und wie oben beschrieben mikroskopisch ausgezählt. Eine Auszählung wurde ebenfalls für die Verdünnungsreihen 1:10 und 1:100 durchgeführt. Diese Methodik wurde ebenfalls für das Auszählen der Zahl Odontoblasten-ähnlicher Zellen und Gingivaepithelzellen angewandt.

2.6 Bakterielle Stimulation

Die Bakterien wurden auf LB-Agar bei 37° C über Nacht inkubiert. Daraus wurden Einzelkolonien isoliert und in LB-Flüssigmedium ebenfalls bei 37° C inkubiert.

Es wurden die Bakterien *Escherichia coli*, Symbioflor® 2 von der Firma SymbioPharm GmbH (Herborn) und *Streptococcus mutans* (freundlicherweise von Prof. Dr. M. Frentzen, Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde, Universitätsklinikum Bonn, zur Verfügung gestellt) eingesetzt.

Zellen pulpaler und gingivaler Herkunft wurden mit *S. mutans* und *E. coli* im Verhältnis Zellzahl:Bakterienzahl = 1:1 über 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten inkubiert. Das niedrige Zahlenverhältnis wurde gewählt, um einen frühen bakteriellen Angriff zu imitieren. Die kurzen Zeitspannen wurden gewählt, um eine schnellverlaufende biologisch-relevante Antwort bzgl. der Expression der Immunabwehr zu untersuchen.

Für die Säurevorbehandlung wurde das Pellet von 2×10^7 Bakterienzellen in 90 µl PBS aufgenommen, dann mit 10 µl 10M HCl versetzt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde mit NaOH neutralisiert (pH 7,0). Die so vorbehandelten Bakterien wurden dann zur Stimulation der Odontoblasten-ähnlichen Zellen und Gingivaepithelzellen eingesetzt.

Für die Thermovorbehandlung wurden in einem zweiten Ansatz die Bakterienpellets in 100 µl PBS aufgenommen und anschließend 15 Minuten bei 95° C erhitzt. Die so vorbehandelten Bakterienzellen wurden ebenfalls zur Stimulation Odontoblasten-ähnlicher Zellen und Gingivaepithelzellen eingesetzt.

2.7 Stimulation von Odontoblasten-ähnlichen Zellen und Gingivaepithelzellen mit *Streptococcus mutans* und *Escherichia coli*

Für die Stimulationsversuche wurden Zellen der 2. Passage in Kulturschalen (Durchmesser: 35 mm) mit 2 ml Kulturmedium, bestehend aus DMEM, 10% FCS, Penicillin, Streptomycin und Amphotericin zu einer Zelldichte von 80-90% Konfluenz gezüchtet. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde ein Wechsel zu serumfreiem Medium vorgenommen.

Die Bakterien wurden in LB-Medium bei 37° C über Nacht angezüchtet.

Die Zellen wurden mit *S. mutans* und *E. coli*, in einem Verhältnis von Zellzahl:Bakterienzahl = 1:1 über einen Zeitraum von 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten, inkubiert. Zusätzlich wurden die gleichen Versuchsreihen durchgeführt mit Bakterienkulturen, die vorher mit HCl und 95° C vorbehandelt wurden (2.6). Als Kontrolle wurde PBS (phosphate buffered saline) dem Kulturmedium hinzugefügt.

Im Anschluss an die Stimulation wurde das Medium bestehend aus Bakterien und Zellen aus der Zellkulturschale aspiriert. Es erfolgte die Zelllysis, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese.

2.7.1 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Für die quantitative Genexpressionsanalyse der bakteriell stimulierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen und Gingivaepithelzellen wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Protect Mini Kit von der Fa. Qiagen (Hilden) extrahiert. Die Extraktion wurde nach Herstellerprotokoll für humane Zellkulturen durchgeführt. Die Gewebeproben wurden mit dem entsprechenden Äquivalent Lysis-Puffer RLT (10 µl 2-Mercaptoethanol; 990 µl RLT) versetzt und homogenisiert. Anschließend wurden die gelösten Proben auf eine RNeasy-Säule pipettiert und zentrifugiert (10.000 rpm; 15 Sekunden). Nach einer Zugabe von 700 µl RW1-Puffer fand ein weiterer Zentrifugationsschritt statt (10.000 rpm; 15 Sekunden). Daraufhin wurden die Säulen zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (10.000 rpm; 2 Minuten). Zuletzt wurde die auf den Säulen gebundene RNA zweimal mit

je 50 µl RNase-freiem Aqua dest. eluiert (10.000 rpm; 1 Minute). Das resultierende Volumen von 100 µl Gesamt-RNA wurde bei -80° C gelagert.

Zur cDNA-Erststrangsynthese wurden aus jeder Probe jeweils 8 µl Gesamt-RNA mit 1 µl dNTP-Mix (10 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP) und 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl) vermischt und 5 Minuten bei 65° C denaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 2 µl 10fach RT-Puffer, 4 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl DTT (Dithiothreitol) (100 mM), 1 µl RNaseOUT (40 U/µl), 1 µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase (50 U/µl) hinzugeführt und für 50 Minuten bei 42° C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 72° C denaturiert. Darauf folgte der RNase-Verdau durch die Zugabe von 1 µl RNaseH (2 U/µl) für 20 Minuten bei 37° C. Alle für die reverse Transkription verwendeten Reagenzien wurden von der Fa. Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

2.8 Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Für die quantitative Amplifizierung der Gene hBD-1, -2, IL-6, IL-8, Cox-2 und DSPP wurden Real-Time-PCR-Analysen mit dem iCycler der Fa. Bio-Rad (München) durchgeführt.

Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit dem im Reagenzmix enthaltenen, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen I®. Dieser Farbstoff bindet in der doppelsträngigen DNA und emittiert Licht der Wellenlänge von 490 nm. Auf diese Weise konnte eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung des PCR-Produktes, Zyklus für Zyklus, aufgezeichnet werden.

Zur quantitativen Amplifizierung wurde jeweils 1 µl der entsprechenden cDNA zu einem Mix aus 0,125 µl Primer (je 100 pmol/µl), 12,5 µl iQ™SYBR® Green Supermix [MgCl₂(6 mM)], dNTP (0,4 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP), Taq DNA Pol (50 U/ml), SYBR Green (20 nM), (pH 8,4)] und 11,375 µl Aqua dest. (RNase-frei) gegeben. Die Reagenzien wurden von der Fa. Bio-Rad (München) bezogen.

Um unterschiedliche Konzentrationen durch ungenaues Pipettieren zu vermeiden, wurde ein Gesamtgemisch („Mastermix“) aus dem iQ™SYBR® Green Supermix, Aqua dest. und Primern hergestellt.

Zu Beginn der PCR wurde eine Denaturierungsphase von 3 Minuten bei 95° C angesetzt. Innerhalb eines Real-Time-PCR-Zyklus fand zunächst eine Denaturierung der cDNA-Moleküle statt (95° C; 15 Sekunden). Darauf folgte die Hybridisierung der Primer, an die cDNA-Fragmente, bei experimentell ermittelter Annealingtemperatur (30 Sekunden). Im Anschluss erfolgte die Elongationsphase (72° C, 30 Sekunden). Insgesamt umfasste die Real-Time-PCR 40 dieser Zyklen.

Tabelle 1:

Darstellung der PCR-Primersequenzen und Anzahl der Basenpaare der bei der Real-Time-PCR verwendeten Primer

Gen	PCR-Primersequenzen	bp	° C
B-Aktin	► 5'-CATGGATGATGATATCGCCGCG-3' ◄ 5'-ACATGATCTGGGTCATCTTCTGC-3'	370	69
hBD-1	► 5'-CATGAGAACTTCCTACCTTCTGC-3' ◄ 5'-TCACTTGCAGCACTTGGCCTT-3'	216	69
hBD-2	► 5'-CATGAGGGTCTTGTATCTCCTCT-3' ◄ 5'-CCTCCTCATGGCTTTTTGCAGC-3'	213	68
IL-6	► 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGC-3' ◄ 5'-CTACATTTGCCGAAGAGCCC-3,	638	68
IL-8	► 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG-3' ◄ 5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC-3'	297	68
Cox-2	► 5'-ATTGACCAGAGCAGGCAGAT-3' ◄ 5'-CAGGATACAGCTCCACAGCA-3'	162	63
DSPP	► 5'-TCACAAGGGAGAAGGGAATGG-3' ◄ 5'-CTTGACAACAGCGACATCCT-3'	316	67

►: Vorwärts-Primer; ◄: Rückwärts-Primer; bp: Basenpaare;

° C: Temperaturoptimum

Die optimale Annealingtemperatur für das jeweilige Gen wurde mit Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt und kontinuierlich mittels der PCR-Negativkontrolle überprüft. Nur bei einer optimalen Annealingtemperatur, bei der die PCR-Negativkontrolle kein PCR-Produkt aufweist, wurde weiterhin bei dieser Temperatur die PCR betrieben.

Somit setzte sich jedes Experiment aus einer PCR-Negativkontrolle, sowie den jeweiligen cDNA-Proben zusammen. Bei der PCR-Negativkontrolle wurde anstatt cDNA Wasser zum Probenmix gegeben. Es sollte hier keinerlei PCR-Produkt entstehen bzw. gemessen werden.

Um die durch unterschiedliche Primer generierten Werte bzw. zwei getrennte Real-Time-Polymerasekettenreaktionen miteinander vergleichen zu können, mussten die Primereffizienzen bestimmt werden. Diese wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen entsprechend klonierter cDNA (Standard) über eine Standardkurve ermittelt. Diese Standardkurve entspricht einer Linearregression, umgekehrt zur logarithmischen Funktion der Fluoreszenzaufzeichnung aus der PCR. Mit Hilfe der Steigung dieser Standardkurve lässt sich die Primereffizienz ermitteln (siehe Tabelle 2, 3.1)

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung der Standardkurve})} = \text{Effizienz}$$

2.9 Auswertung der quantitativen PCR

Alle untersuchten Proben wurden anhand der unstimulierten Kontrolle und des Housekeeping-Gens β -Aktin ausgewertet. Die β -Aktin mRNA wird in allen Zellen in einem nahezu gleichen Verhältnis exprimiert (Bustin, 2002 und 2000; Ke et al., 2000; Thellin et al., 1999; Vandesompele et al., 2002). Bei der Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR wurde die Normalisierung der Ergebnisse anhand der Genexpression von β -Aktin-Primern zur Normalisierung der Ergebnisse vorgenommen (Bustin, 2002 und 2000; Ke et al., 2000; Thellin et al., 1999; Vandesompele et al., 2002).

Alle Ergebnisse wurden zunächst durch den oben beschriebenen Schwellenwert (Ct-Wert) dargestellt. Die Methode nach Pfaffl ermittelt die Änderung der Genexpression im Vergleich zum Housekeeping-Gen und zur unstimulierten Kontrolle. Der Wert wird hier

als x-fache Änderung der entsprechenden Genexpression angegeben (Pfaffl, 2001). Im ersten Schritt wurde die Primereffizienz der Referenz- und der Zielprimer errechnet. In einem zweiten Rechenschritt wurden die jeweiligen ΔCt -Werte der einzelnen Proben erarbeitet. Es wurde eine Differenz gebildet, bei welcher der ΔCt -Wert aus dem Ct-Wert des House-Keeping-Genes und dem des Zielgens der unstimulierten Kontrolle ermittelt wurde. Dieses entsprach der Referenz.

Die zweite Differenz für den ΔCt -Wert wurde aus dem Ct-Wert des House-Keeping-Genes und dem des Zielgens der untersuchten Probe (Wert für das Zielgen) berechnet. In einer weiteren Formel wurde dann der entsprechende Quotient ermittelt, welcher die x-fache Änderung der Genexpression angab:

$$\text{Quotient} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Ct\text{-Zielgen(Kontrolle-Probe)}} / (E_{\text{Referenz}})^{\Delta Ct\text{-Referenz(Kontrolle-Probe)}}$$

(Pfaffl, 2001)

Die Versuchsreihen sind mit derselben Zelllinie einfach durchgeführt worden. Deshalb ist eine statistische Auswertung nicht möglich. Um dennoch Aussagen treffen zu können, sollten Expressionsänderungen unterhalb des Faktors 20 als tendenziell biologisch relevant angesehen werden. Hierbei wird berücksichtigt, dass Ct-Werte ein und derselben Probe bezüglich eines Genes um einen Zyklus variieren können. Daraus ergibt sich eine Schwankung um den Faktor 4 bei zwei untersuchten Genen bzw. Faktor 16 bei einem Vergleich stimulierter gegen unstimulierte Probe. Weiterhin ist zur Aussage von Genexpressionsänderungen eine Analyse bezüglich des gesamten Zeitintervalls (t0 bis 240 min.) berücksichtigt worden.

3. Ergebnisse

Odontoblasten-ähnliche Zellen und Gingivaepithelzellen wurden mit *S. mutans* und *E. coli* bzw. mit säure- und hitzebehandelten *S. mutans* und *E. coli* für 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten stimuliert. Die quantitative Analyse der Genexpression von hBD-1, hBD-2, IL-6, IL-8, Cox-2 und DSPP wurde mit Hilfe der Real-Time PCR durchgeführt.

3.1 Optimierung der Real-Time-PCR

Die Bedingungen der Real-Time-PCR wurden optimiert, indem für jedes einzelne Gen mit den entsprechenden klonierten PCR-Produkten, die optimalen Temperaturen der dazugehörigen Primer bestimmt wurden. Die Effizienzen zur Berechnung der relativen Genexpressionen nach Pfaffl (2001) wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen ermittelt. Diese sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2:

Darstellung der Effizienzen von β -Aktin, hBD-1, -2, IL-6, IL-8, Cox-2 und DSPP aus der Real-Time-PCR

Gene	Effizienz
β -Aktin	1,83
hBD-1	2,07
hBD-2	2,05
IL-8	2,01
IL-6	2,12
Cox-2	2,17
DSPP	1,83

3.2 Quantitative Genexpressionsanalyse

Aufgrund der Erkenntnis, dass sowohl Odontoblasten in kariösen Läsionen als auch Gingivaepithelzellen früh einem Antigenkontakt durch Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte ausgesetzt sind, wurden in dem Hauptversuch Odontoblasten-ähnliche Zellen und Gingivaepithelzellen mit *S. mutans* und *E. coli* stimuliert.

Anschließend wurden die Genexpressionsraten von hBD-1, -2, IL-6, IL-8, Cox-2 und DSPP für die Zeit von 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten nach Stimulierung bestimmt.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Bakterienkulturen mit HCl und 95° C vorbehandelt und erneut zur Stimulierung der odontoblasten-ähnlichen Zellen und der Gingivaepithelzellen verwendet, wobei auch hier die Expression der oben genannten Mediatoren zu den gleichen Zeiten untersucht wurde. Ziel war es die Genexpressionsprofile aus beiden Versuchsreihen miteinander zu vergleichen und somit auf die Säure- und Thermostabilität des stimulierenden Agens zu schließen.

Alle untersuchten Proben wurden anhand der unstimulierten Kontrolle und des Housekeeping-Gens β -Aktin ausgewertet.

3.2.1 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit *S. mutans*

Nach Stimulation der Odontoblasten-ähnlichen Zellen mit *S. mutans* konnte eine deutliche Erhöhung der Expression von IL-8 und IL-6 und ein tendenzieller Anstieg der Expressionsraten von hBD-1, -2, DSPP und Cox-2 beobachtet werden. Die deutliche Expressionserhöhung von IL-8 und IL-6 ist nach 240 Minuten feststellbar und betrug das 42- bzw. 34-fache im Vergleich zur Kontrolle. Eine 18-fache Steigerung der Expressionsrate von hBD-1 konnte ebenfalls nach 240 Minuten beobachtet werden. Dagegen konnte bei hBD-2 schon nach 15 Minuten eine Zunahme der Expression auf das Doppelte des Ausgangswertes verzeichnet werden, die jedoch im weiteren Zeitverlauf wieder abnahm, so dass hier von einer Tendenz zur Expressionserhöhung gesprochen werden kann. Die mRNA Expression von Cox-2 betrug nach 15 Minuten

das 5-fache der mRNA Expression der Kontrolle. Es konnten im weiteren Stimulationszeitraum keine deutlichen Änderungen mehr beobachtet werden.

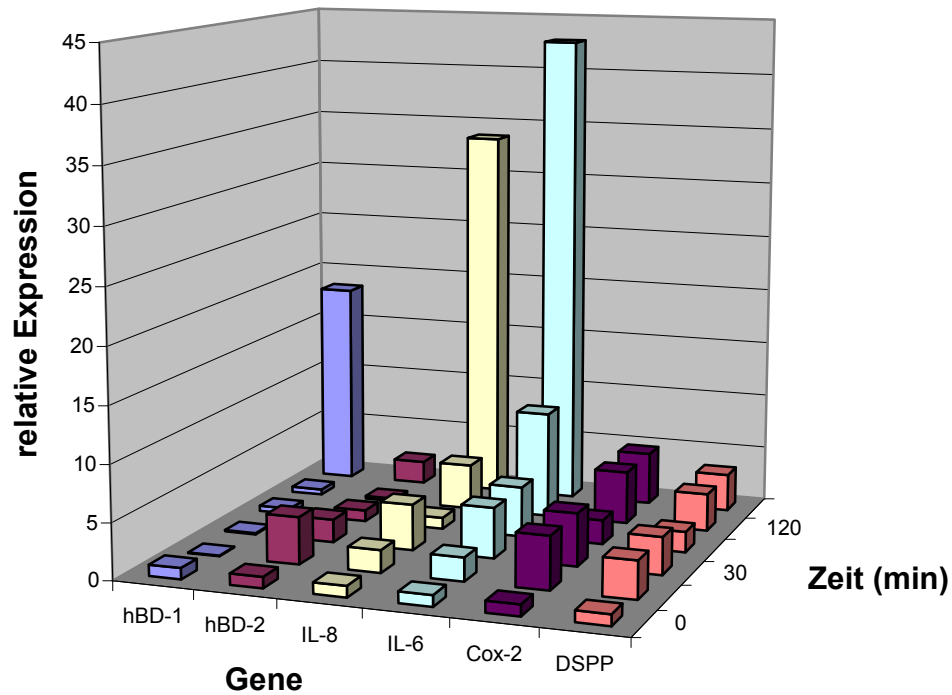


Abbildung 1:

Darstellung der relativen Expression (zeitabhängig) von hBD-1, -2, IL-6, IL-8, Cox-2 und DSPP in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit *S. mutans* im Verhältnis Zellzahl:Bakterienzahl = 1:1. Es konnte eine erhöhte Expression von hBD-1, IL-8 und IL-6 und ein tendenzieller Anstieg der Expressionsraten von hBD-2, DSPP und Cox-2 festgestellt werden.

3.2.2 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit säurebehandelten *S. mutans*

Nach Inkubation der Bakterien über Nacht mit HCl und nach anschließender Neutralisation wurden diese zur Stimulierung der Odontoblasten-ähnlichen Zellen verwendet. Es zeigte sich eine deutliche Veränderung im Expressionsmuster im Vergleich zur Genexpression nach Stimulierung der Odontoblasten-ähnlichen Zellen mit unbehandelten *S. mutans*-Bakterien (3.3.1). Im Vergleich zur mRNA Expression von IL-8 in unstimulierten Zellen konnte ein 550-facher Anstieg der mRNA Expression nach Stimulation mit säurebehandelten *S. mutans* festgestellt werden (Stimulationszeit: 240 min). Die Stimulierung der Odontoblasten-ähnlichen Zellen mit säurebehandelten Bakterien führte dagegen zu keiner signifikanten Expression von hBD-1, und -2, IL-6, Cox-2 und DSPP.

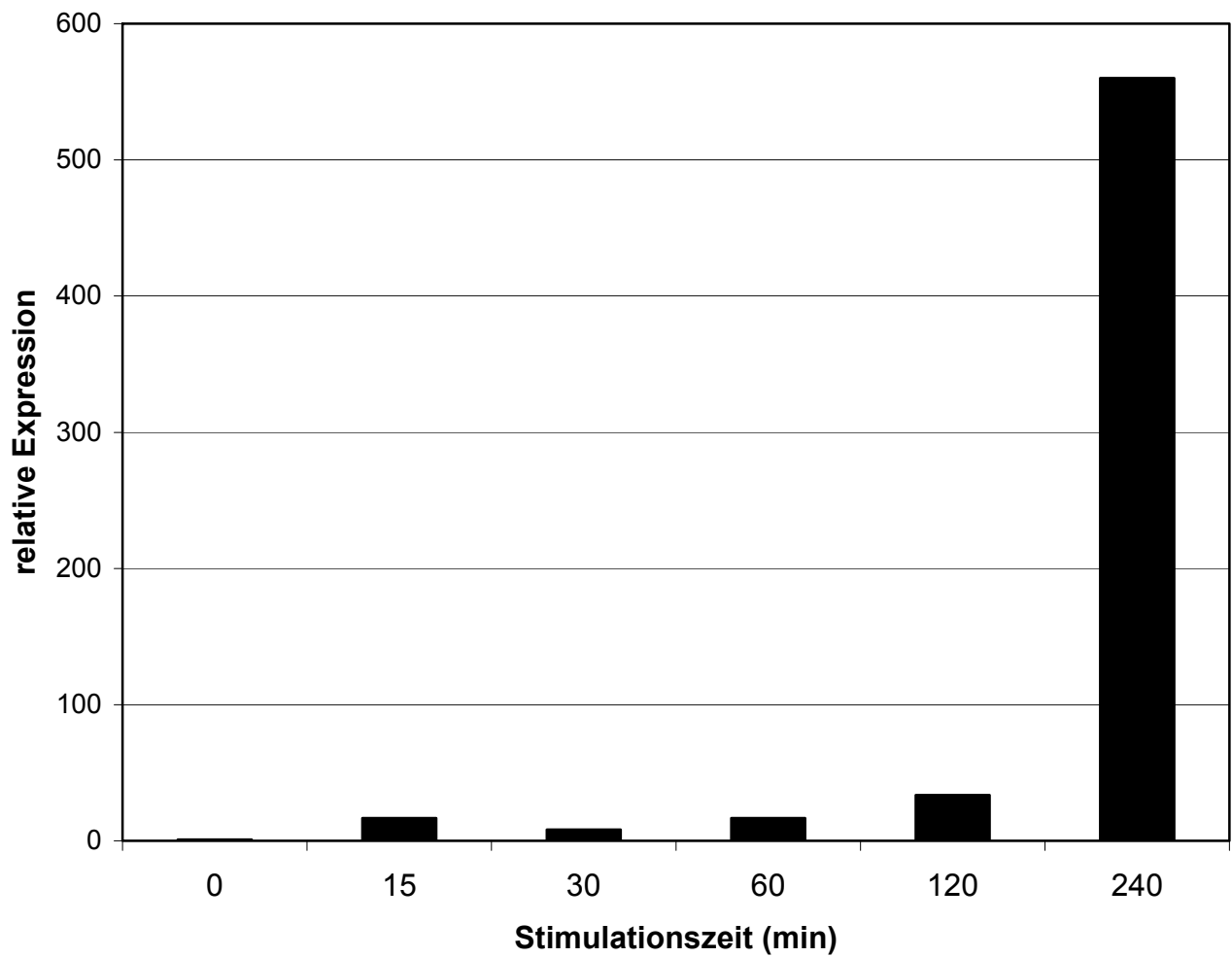


Abbildung 2:

Darstellung der relativen Genexpression von IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit säurevorbehandelten Bakterien. Für die Expression von IL-8 konnte eine ca. 550-fache Erhöhung der Expression innerhalb des Stimulationszeitraumes beobachtet werden.

3.2.3 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit hitzebehandelten *S. mutans*

Nach Erhitzen der Bakterienkultur auf 95° C und anschließender Stimulierung der Odontoblasten-ähnlichen Zellen konnte nach 240 Minuten eine Expressionsänderung für

IL-8 festgestellt werden. Für hBD-1, und -2, IL-6, Cox-2 und DSPP konnten keine Expressionsänderungen innerhalb des Zeitversuches beobachtet werden.

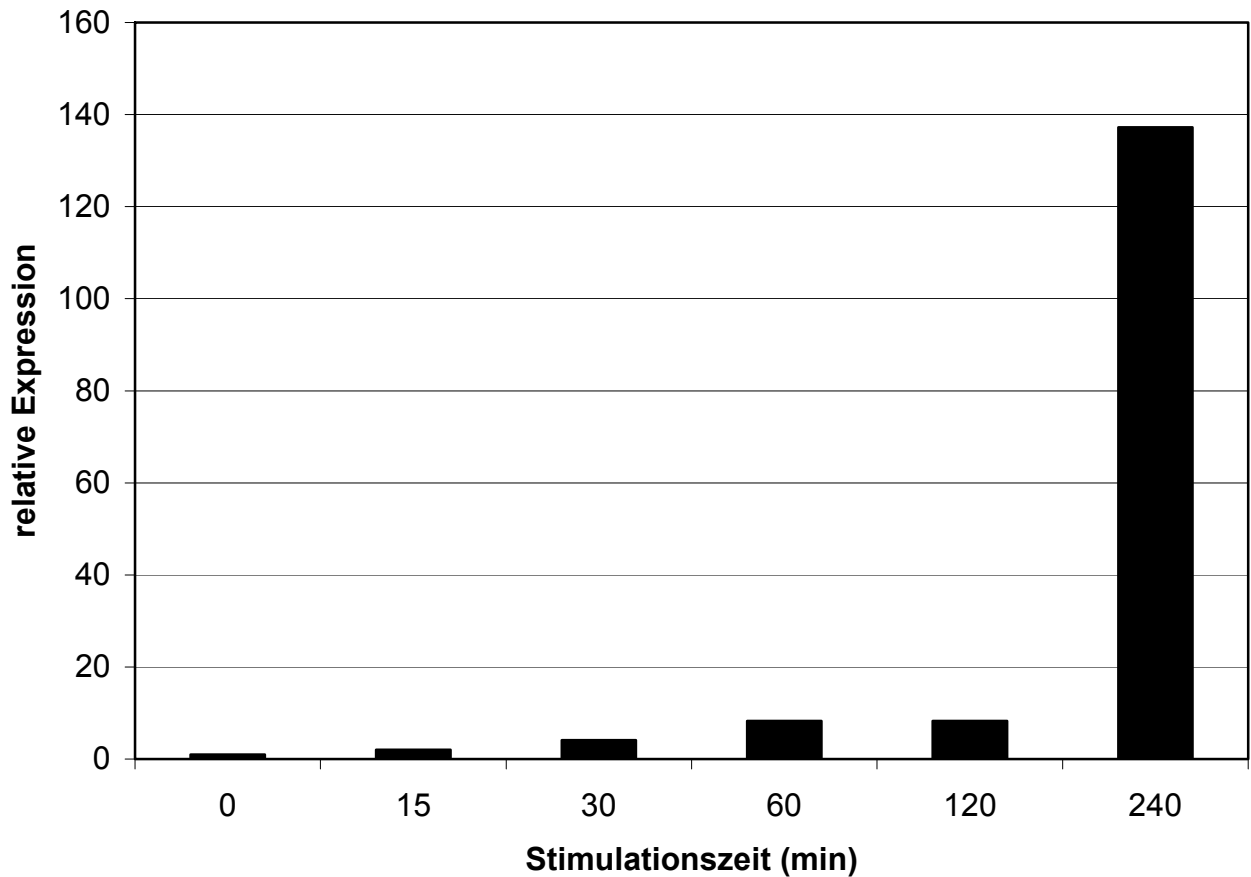


Abbildung 3:

Darstellung der relativen Genexpression von IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit hitzebehandelten Bakterien. Es konnte eine ca. 140-fache Erhöhung der Expression für IL-8 nach 240 Minuten festgestellt werden.

3.2.4 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit *E. coli*

Nach Stimulation der Odontoblasten-ähnlichen Zellen mit *E. coli* konnte eine stark erhöhte Expression von IL-8 und eine tendenzielle Erhöhung der Expression von IL-6 und Cox-2 verzeichnet werden. Die Expression für IL-8 stieg bereits nach 15 Minuten

auf das 15-fache des Ausgangswertes und erreichte nach 240 Minuten einen um das 65-fache erhöhten Wert. Bei IL-6 konnte eine Verdopplung der Expression nach 15 Minuten und eine Verdreifachung nach 240 Minuten beobachtet werden. Bei Cox-2 konnte ein ähnliches Bild der Expression beobachtet werden. Jeweils nach 15 und 240 Minuten konnte eine Verdreifachung der Expressionsraten gemessen werden.

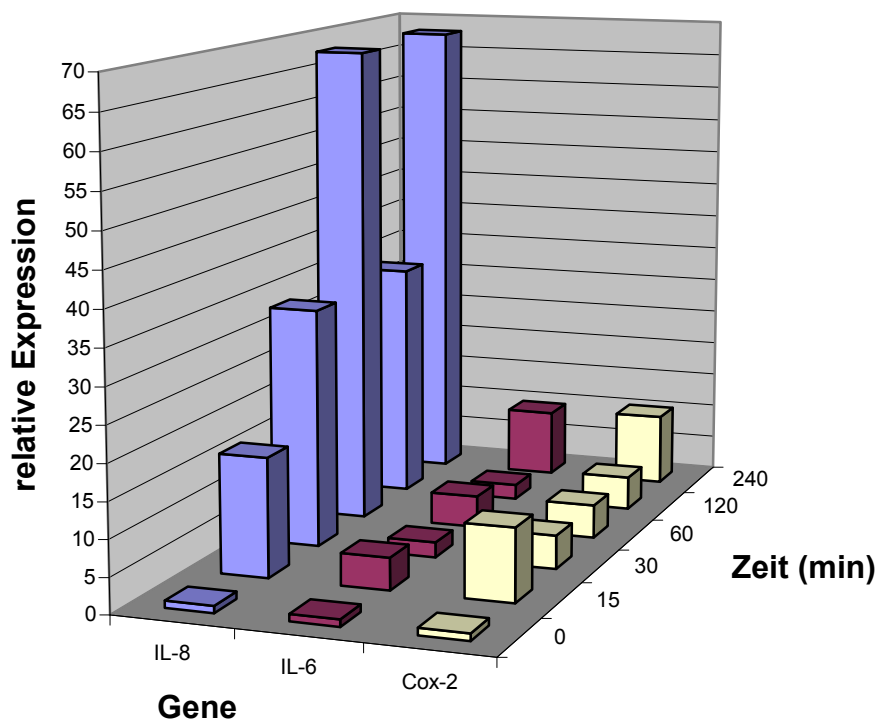


Abbildung 4:

Darstellung der relativen Expression von IL-6, IL-8 und Cox-2 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit *E. coli* im Verhältnis Zellzahl: Bakterienzahl = 1:1. Es konnte eine ca. 65-fache Erhöhung der Expression für IL-8 nach 240 Minuten festgestellt werden.

3.2.5 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit säurebehandelten *E. coli*

Nach Stimulation der Odontoblasten-ähnlichen Zellen mit HCl vorbehandelten Bakterien konnte eine verstärkte Expression von IL-8 und eine tendenzielle Erhöhung der Expression von IL-6 festgestellt werden. Die Expression für IL-8 betrug nach 120 Minuten bereits das 200-fache und nach 240 Minuten das 1000-fache der mRNA Expression, gemessen in der Kontrolle.

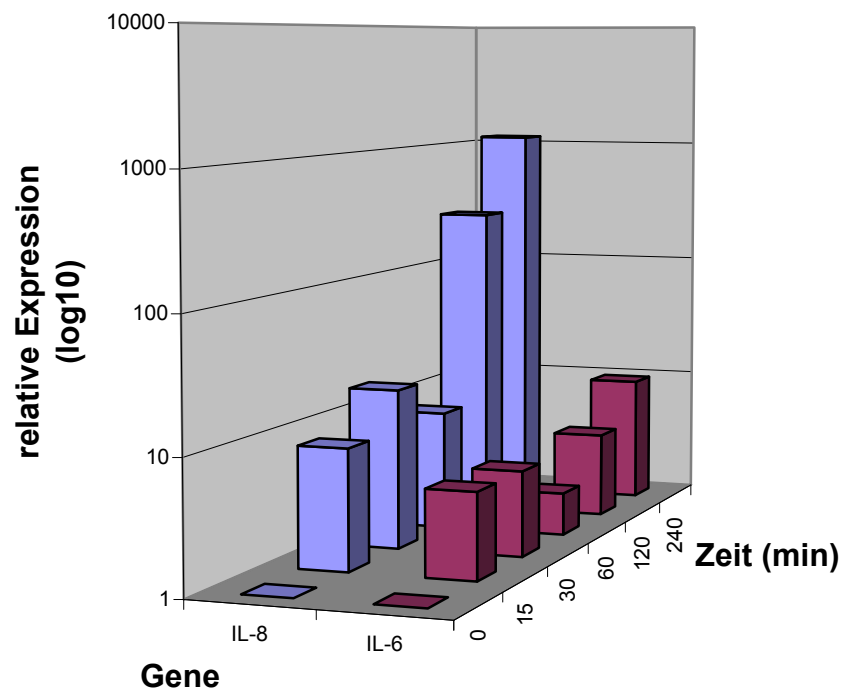


Abbildung 5:

Darstellung der relativen Genexpression von IL-6 und IL-8 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit säurevorbehandelten *E. coli*. Die Expression für IL-8 zeigte eine ca. 1000-fache Erhöhung innerhalb des Zeitversuches.

3.2.6 Genexpression bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit hitzebehandelten *E. coli*

Nach Erhitzen der Bakterienzellkultur auf 95° C und anschließender Stimulation der Odontoblasten-ähnlichen Zellen konnte eine deutlich erhöhte Expression von IL-8 und eine tendenzielle Erhöhung der Expression von Cox-2 festgestellt werden. Bei IL-8 konnte während des Zeitversuches ein Anstieg der Expression auf das 65-fache beobachtet werden. Bei Cox-2 konnte, innerhalb des Stimulationszeitraumes, nur ein Expressionsanstieg auf das 2-fache festgestellt werden.

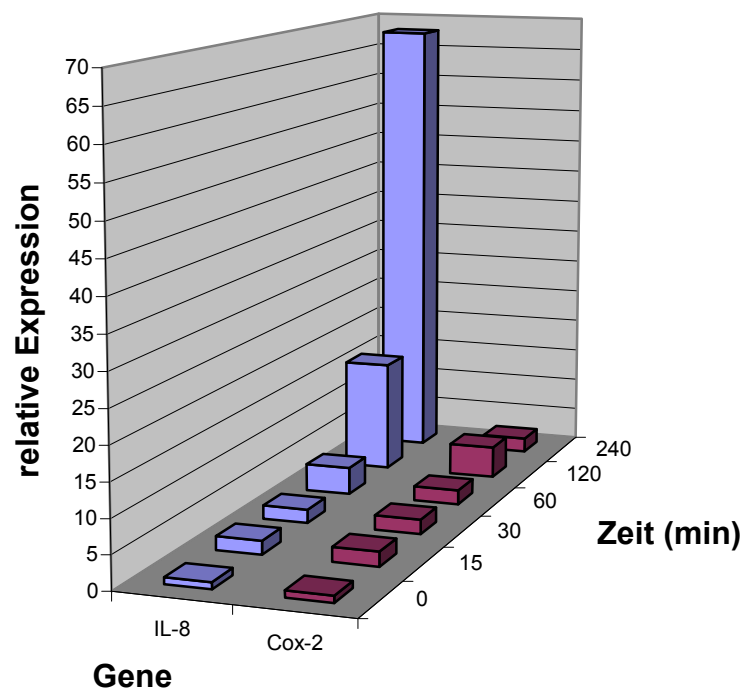


Abbildung 6:

Darstellung der relativen Genexpression von IL-8 und Cox-2 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit hitzebehandelten *E. coli*. Bei IL-8 konnte zeitabhängig ein Anstieg der Expression auf das 65-fache beobachtet werden.

3.2.7 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit *S. mutans*

Nach Stimulation von Gingivaepithelzellen mit *S. mutans* konnte ein Anstieg der Expression von hBD-1, hBD-2, IL-6, IL-8 und Cox-2 verzeichnet werden. Für die hBD-1 Expression konnte ein kontinuierlicher Anstieg innerhalb des Zeitversuches auf das 6-fache beobachtet werden. Dagegen konnte bei hBD-2 ein Anstieg auf das ca. 15-fache verzeichnet werden. Für IL-8 und IL-6 konnte ebenfalls ein kontinuierlicher Expressionsanstieg festgestellt werden. Für IL-8 konnte ein Anstieg der mRNA Expression auf das 65-fache, für IL-6 auf das 45-fache und für Cox-2 auf das 20-fache im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gezeigt werden (Stimulationszeit 240 min).

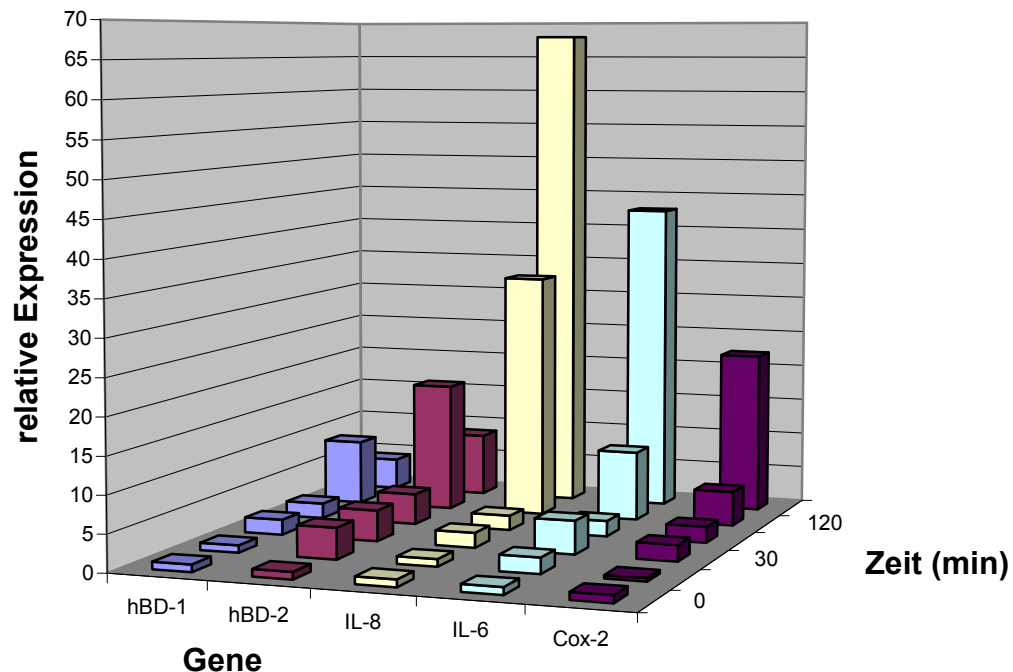


Abbildung 7:

Darstellung der relativen Expression (zeitabhängig) von hBD-1, und -2, IL-6, IL-8 und Cox-2 in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit *S. mutans* im Verhältnis Zellzahl: Bakterienzahl = 1:1. Ein Anstieg der mRNA Expression konnte für IL-8 auf das 65-fache, für IL-6 auf das 45-fache und für Cox-2 auf das 20-fache im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle dokumentiert werden (Stimulationszeit 240 min) Die mRNA Expressionsraten des humanen β -Defensins-1 und -2 wurden ebenfalls durch die Stimulation mit *S. mutans* beeinflusst.

3.2.8 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit säurebehandelten *S. mutans*

Nach Inkubation der Bakterien über Nacht mit HCl und nach anschließender Neutralisation wurden diese ebenfalls zur Stimulierung der Gingivaepithelzellen verwendet. Es konnte keine Expressionsänderung für die Gene hBD-1 und -2

festgestellt werden. Bei IL-6 und Cox-2 konnte eine leichte Erhöhung (4-fach) der mRNA Expression innerhalb des Zeitversuches beobachtet werden.

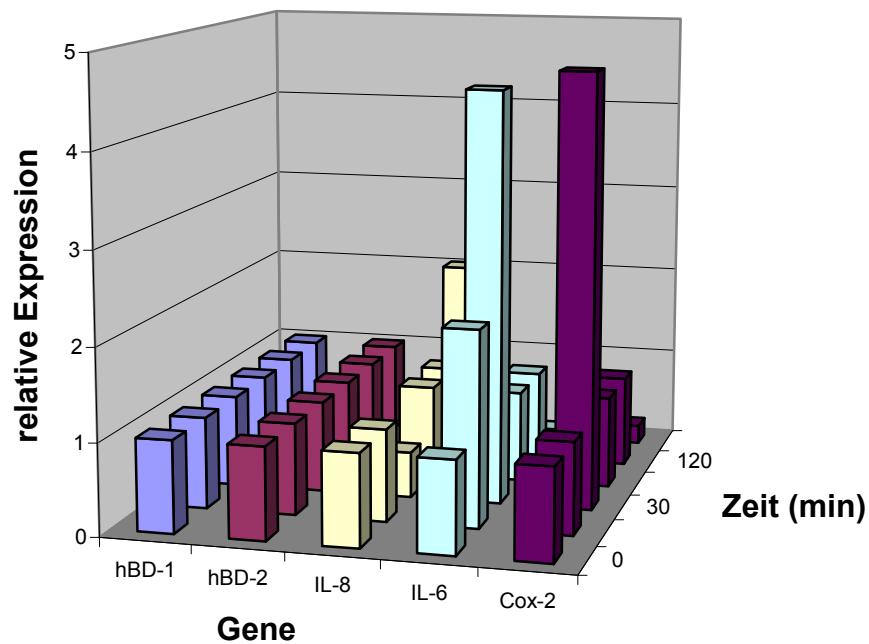


Abbildung 8:

Darstellung der relativen Genexpression von hBD-1, und -2, IL-6, IL-8 und Cox-2 in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit säurevorbehandelten *S. mutans*-Bakterien. Bei IL-6 und Cox-2 konnte eine zeitabhängige Erhöhung der Expression beobachtet werden.

3.2.9 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit hitzebehandelten *S. mutans*

Nach Erhitzen der Bakterienkultur auf 95° C und anschließender Stimulierung der Gingivaepithelzellen konnte ein fast identisches Bild zur Stimulierung mit säurebehandelten *S. mutans*-Bakterien festgestellt werden. Es konnte ein Abfall der Expression von hBD-1 und hBD-2 beobachtet werden. Innerhalb des Zeitversuches konnte für IL-8 eine Erhöhung (3,5-fach) der Expression nach 30 Minuten verzeichnet werden. Einen tendenziellen Anstieg zeigte ebenfalls die Expression von IL-6 und Cox-2.

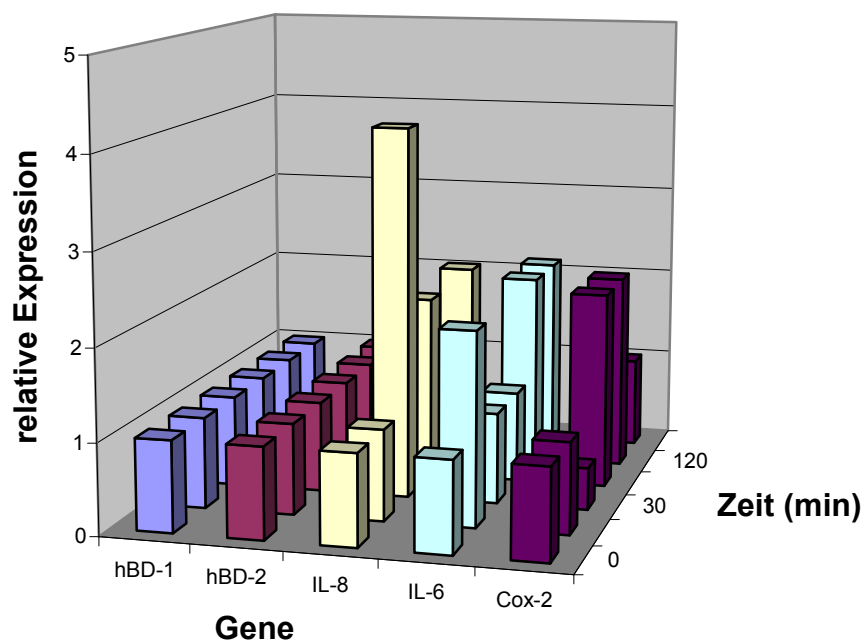


Abbildung 9:

Darstellung der relativen Genexpression von hBD-1, und -2, IL-6, IL-8 und Cox-2 nach Stimulation von Gingivaepithelzellen mit hitzebehandelten Bakterien. Es konnte zeitabhängig eine 3,5-fache Erhöhung der Expression von IL-8 verzeichnet werden.

3.2.10 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit *E.coli*

Nach Stimulation der Gingivaepithelzellen mit *E. coli* im Verhältnis Bakterienzahl:Zellzahl = 1:1 konnte eine Expressionserhöhung für die Gene hBD-1, IL-8 und Cox-2 gemessen werden. Innerhalb des Zeitversuches lag das Maximum für hBD-1 nach 30 Minuten und betrug das 8,5-fache. Die mRNA Expression von IL-8 zeigte nach 30 Minuten einen 7,5-fachen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Einen tendenziellen Anstieg der Expression konnte während der gesamten Versuchszeit bei Cox-2 beobachtet werden. Die Expressionsraten des humanen β -Defensins-2, sowie des Interleukins-6 wurden in Gingivaepithelzellen durch die Stimulation mit *E. coli* nicht beeinflusst.

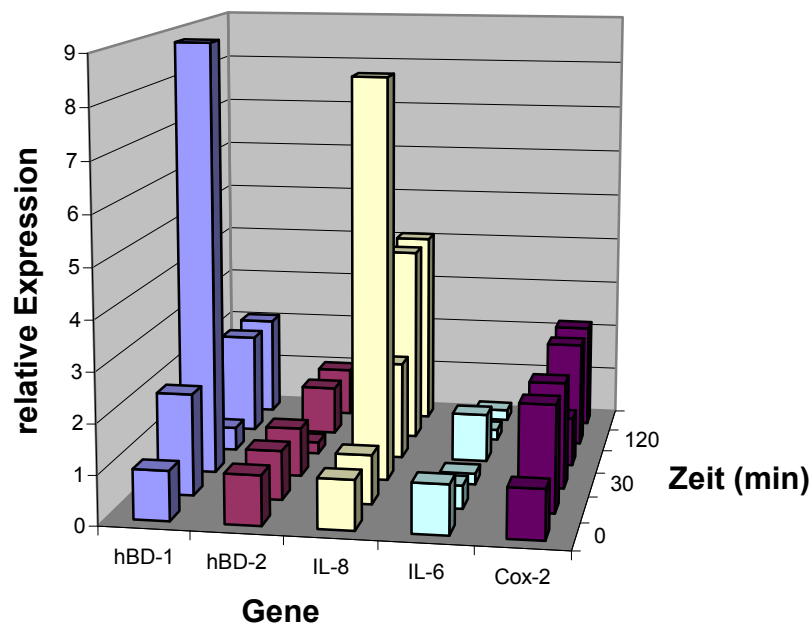


Abbildung 10:

Darstellung der relativen Expression von hBD-1, und -2, IL-6, IL-8 und Cox-2 in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit *E. coli* im Verhältnis Zellzahl: Bakterienzahl = 1:1. Für hBD-1 und IL-8 konnte nach 30 Minuten eine Expressionserhöhung der mRNA um das ca. 8- bzw. 7-fache im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gezeigt werden.

3.2.11 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit säurebehandelten *E. coli*

Nach Stimulation der Gingivaepithelzellen mit Bakterien, die über Nacht mit HCl inkubiert und anschließend neutralisiert wurden, konnte ein tendenzieller Anstieg der Expressionsraten von IL-8, IL-6 und Cox-2 verzeichnet werden. Darüber hinaus konnte eine leicht erhöhte Expression für Cox-2 festgestellt werden.

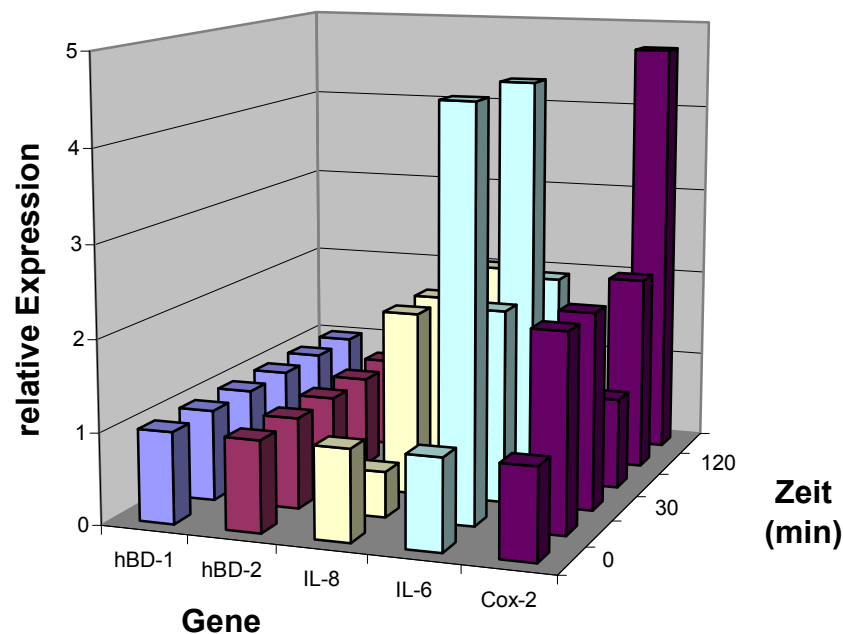


Abbildung 11:

Darstellung der relativen Genexpression von hBD-1, und -2, IL-6, IL-8, Cox-2 in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit säurevorbehandelten *E. coli*. Zeitabhängig konnte eine ca. 4-fache Erhöhung der Expression von IL-6 und Cox-2 verzeichnet werden.

3.2.12 Genexpression bei Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit hitzebehandelten *E. coli*

Nach Erhitzen der Bakterienkultur auf 95° C und anschließender Stimulierung der Gingivaepithelzellen konnte ein Anstieg der Expression von IL-6 verzeichnet werden. Diese erreichte nach 30 Minuten ihr Maximum auf das ca. 4-fache der mRNA Expression in der unstimulierten Kontrolle. Die Expressionsraten aller anderen untersuchten Gene werden nicht entscheidend beeinflusst.

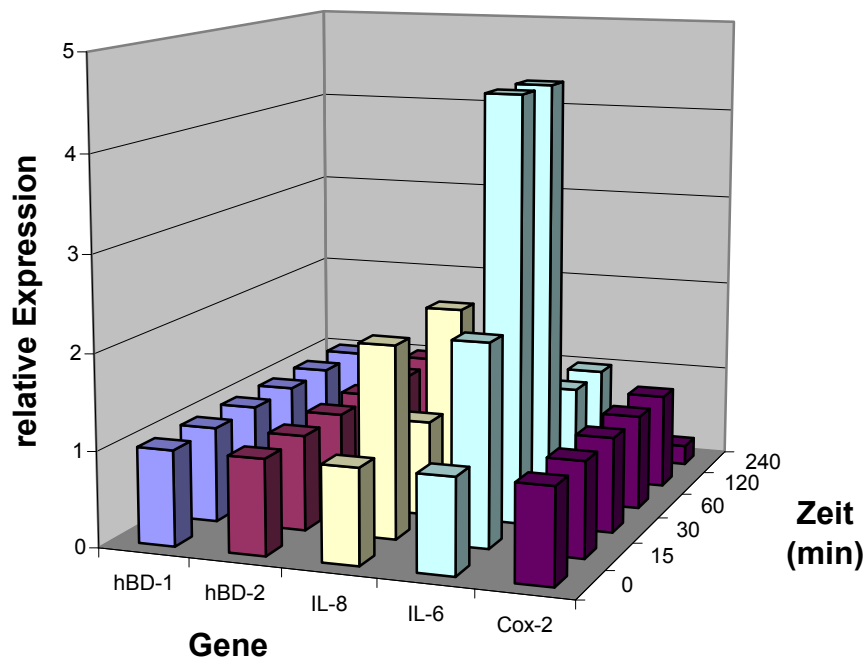


Abbildung 12:

Darstellung der relativen Genexpression von hBD-1, und -2, IL-6, IL-8 und Cox-2 nach Stimulation von Gingivaepithelzellen mit hitzebehandelten *E. coli*-Bakterien. Zeitabhängig konnte eine 4-fache Erhöhung der mRNA Expression von IL-6 festgestellt werden.

3.3 Übersicht der Genexpression in Odontoblasten-ähnlichen Zellen

Tabelle 3:

Übersicht der Genexpression von hBD-1, -2, IL-6, IL-8, Cox-2 und DSPP in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach Stimulation mit nativen und vorbehandelten *E. coli*- und *S. mutans*-Bakterien.

Übersicht der Genexpression von Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach bakterieller Stimulation

Gen	<i>Streptococcus mutans</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	nativ	95° C	HCl	nativ	95° C	HCl
hBD-1	+	o.E.	o.E.	o.E.	o.E.	o.E.
hBD-2	+	o.E.	o.E.	o.E.	o.E.	o.E.
IL-8	++	+++	+++	++	++	+++
IL-6	++	o.E.	o.E.	+	o.E.	+
COX-2	+	o.E.	o.E.	+	+	o.E.
DSPP	+	o.E.	o.E.	o.E.	o.E.	o.E.

o.E. = ohne Effekt; + = erhöhte Expression (2- bis 20-fach); ++ = stark erhöhte Expression (20- bis 50-fach); +++ = sehr stark erhöhte Expression (>50-fach)

3.4 Übersicht der Genexpression in Gingivaepithelzellen

Tabelle 4:

Übersicht der Genexpression von hBD-1, -2, IL-8, IL-6 und Cox-2 in Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit nativen und vorbehandelten *S. mutans*- und *E. coli*-Bakterien.

Übersicht der Genexpression von Gingivaepithelzellen nach bakterieller Stimulation

Gen	<i>Streptococcus mutans</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	nativ	95° C	HCl	Nativ	95° C	HCl
hBD-1	+	o.E.	o.E.	+	o.E.	o.E.
hBD-2	+	o.E.	o.E.	o.E.	o.E.	o.E.
IL-8	++	+	o.E.	+	o.E.	+
IL-6	++	+	+	o.E.	+	+
Cox-2	++	+	+	+	o.E.	+

o.E. = ohne Effekt; + = erhöhte Expression (2- bis 20-fach); ++ = stark erhöhte Expression (20- bis 50-fach); +++ = sehr stark erhöhte Expression (>50-fach)

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an Kulturen von Odontoblasten-ähnlichen Zellen und Gingivaepithelzellen durchgeführt. Beide Zellkulturen wurden mit *Streptococcus mutans* und *Escherichia coli* über variable Zeiträume stimuliert. Im Anschluß wurde die mRNA extrahiert und die cDNA (oligo-(dT)-Primer) Synthese durchgeführt. Die Auswertung der Stimulationsexperimente erfolgte mittels der Real-Time-PCR-Technik.

Das Ziel dieser Arbeit war es somit, zunächst die Genexpression der humanen β -Defensine-1, und -2, IL-6, IL-8, Cox-2 und DSPP in Odontoblasten-ähnlichen Zellen und Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit *S. mutans* und *E. coli* nachzuweisen. Besonderes Augenmerk galt dabei dem direkten Vergleich beider Zelltypen, die trotz unterschiedlicher embryonaler Herkunft ähnliche Eigenschaften der Bakterienabwehr zu besitzen scheinen. Darauf folgend sollte die Genexpression derselben Gene nach Stimulation der Zellkulturen mit säure- und hitzebehandelten Bakterien untersucht werden und mit der Genexpression aus den ersten Versuchsreihen verglichen werden.

Odontoblasten-ähnliche Zellen und Gingivaepithelzellen wurden mit *S. mutans* und *E. coli* im Verhältnis Zellzahl:Bakterienzahl = 1:1 über einen Zeitraum von 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten stimuliert. Das niedrige Zellenverhältnis wurde gewählt, um eine beginnende bakterielle Kolonisation zu imitieren. Die kurzen Zeitspannen wurden gewählt, um eine frühe Antwort bezüglich der Expression der oben genannten Gene der Immunabwehr zu untersuchen. Es wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse von hBD-1, -2, IL-6, IL-8, Cox-2 und DSPP mit Hilfe der Real-Time PCR durchgeführt. Bei der Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein thermozyklisches Verfahren, womit bereits kleine Mengen spezifischer DNA-Fragmente mit hoher Ausbeute (exponentiell) amplifiziert werden. Die zur Analyse der Genexpression verwendete Real-Time-PCR ist ein sehr sensitives Verfahren und erlaubt neben der üblichen Amplifizierung der cDNA zusätzlich eine Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen. Die Fluoreszenzaufzeichnung aus einer Probe erfolgt dann, wenn das Fluoreszenzsignal des amplifizierten Produktes mindestens 5% stärker ist als die Hintergrundfluoreszenz der Reaktion (Schwellenwertzyklus / „Crossing point“)

(Bustin, 2002 und 2000). Als interner Standard für alle Polymerasekettenreaktionen wurde β -Aktin gewählt. β -Aktin ist als Bestandteil des Zytoskeletts ein häufiges Protein in Eukaryonten und besitzt eine konstitutive, nicht-alternierende Expression. Die Darstellung der mRNA Expression von β -Aktin bietet daher die Möglichkeit, den Erfolg der reversen Transkriptionspolymerasekettenreaktion unmittelbar zu überprüfen. Darüberhinaus dienen die ermittelten Werte zur Normalisierung der Real-Time-PCR-Ergebnisse. Die Genexpression von β -Aktin konnte in allen Proben sowohl im Rahmen der qualitativen als auch der quantitativen Analyse nachgewiesen werden. Aufgrund dessen konnten die C_t -Werte der zu untersuchenden Gene hBD-1, -2, IL-6, IL-8, Cox-2 und DSPP, des Standards β -Aktin und der jeweiligen unstimulierten Kontrollen zusammen mit den entsprechenden Primereffizienzen mittels der Formel nach Pfaffl in Korrelation gebracht und die relativen Expressionen berechnet werden (Pfaffl, 2001).

Odontoblasten sind zahnhartsubstanzbildende Zellen, die im Gegensatz zu den Ameloblasten (schmelzbildende Zellen) zeitlebens die Fähigkeit behalten, Dentin zu generieren. Es sind also Zellen der Zahnpulpa, die nicht nur im Verlauf der Zahnentwicklung die Vorstufe des Zahndentins, das so genannte Prädentin, synthetisieren können, sondern zeitlebens aktiv bleiben (Schroeder, 1992). Man unterscheidet hierbei die Bildung von Primärdentin mit formativem Charakter von der alterungsbedingten Bildung von Sekundärdentin sowie die Bildung von Tertiärdentin, welche als Abwehr- oder Schutzreaktion des Pulpagewebes gewertet werden kann (Hellwig et al., 2003). Dieser Schutzmechanismus der Odontoblasten ist besonders hervorzuheben, denn diese Zellen stellen anatomisch die erste Zellschicht dar, die direkt an das Dentin grenzt. Im Falle einer bakteriellen Infektion aufgrund einer kariösen Destruktion sind die Odontoblasten ebenfalls die ersten Zellen, die mit den Mikroorganismen oder deren Stoffwechselprodukte in Wechselwirkung treten. Die Odontoblasten reagieren jedoch nicht nur mit der Bildung von Tertiärdentin, vielmehr sind sie in der Lage, eine Immunantwort zu initiieren. In Versuchsreihen mit Karies verursachenden Bakterien, wie *S. mutans* konnte gezeigt werden, dass in Pulpazellen vermehrt Zytokine (IL-6 und IL-8), sowie Enzyme der Eicosanoidbiosynthese (Cox- 2, cPLA₂) synthetisiert werden (Eberhard et al., 2005; Engels- Deutsch et al., 2003; Hahn et al., 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass im Gewebe der Zahnpulpa

die mRNA humaner β -Defensine präsent ist (Dommisch et al., 2007a und b; Dommisch et al., 2005a).

Die Odontoblasten-ähnlichen Zellen zeigten eine Expression des Dentinsialophosphoproteins (DSPP). DSPP ist an dem Mineralisationsprozess des Dentins beteiligt und ist die Bezeichnung für zwei aus einem einzelnen Gen hervorgegangener Proteine (Narayanan et al., 2006). DSPP wird überwiegend von Odontoblasten produziert und daher auch als Odontoblastenmarker angesehen (MacDougall et al., 1997). Mit dem Nachweis der Genexpression des Odontoblastenmarkers DSPP konnte der in der vorliegenden Studie kultivierte Zelltyp als Odontoblasten-ähnliche Zellen charakterisiert werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression des Dentinsialophosphoproteins durch antimikrobielle Peptide MIP-3 α und hBD-2 beeinflusst werden kann (Shiba et al., 2003). Als Ergebniss in dieser Arbeit konnte eine moderate Erhöhung der DSPP-Expression nach Stimulation der Odontoblasten-ähnlichen Zellen mit *S. mutans* verzeichnet werden.

Im Zuge der Kariesprogression kommt es zunächst zur Diffusion bakterieller Antigene und im nächsten Schritt zu einer Invasion pathogener Mikroorganismen in die Zahnpulpa. Der Pulpa–Dentin Komplex reagiert in der Regel mit einer entzündlichen Reaktion (Izumi et al., 1995). Die ersten Zellen, die mit diesen pathogenen Antigenen in Wechselwirkung treten und möglicherweise am Anfang einer entzündlichen pulpalen Reaktion stehen, waren Gegenstand dieser Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass *Streptococcus mutans* sowohl für die Induktion als auch für die Progression der Karies verantwortlich ist und somit ein wichtiger ätiologischer Faktor der Karies ist (Donkersloot and Hoerman, 1974). Um sich vor diesem bakteriellen Angriff zu schützen, besitzt das pulpale Gewebe die Möglichkeit, verschiedene Faktoren des Immunsystems zu aktivieren (Jontell et al., 1998). In mehreren Versuchsreihen wurde gezeigt, dass *S. mutans* eine erhöhte Expression an IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 induziert (Engels-Deutsch et al., 2003; Hahn et al., 2000). Übereinstimmend mit der Studie von Engels-Deutsch und Mitarbeiter wurde eine Erhöhung der mRNA Expression von IL-6 und IL-8 nach erfolgter Stimulation der Odontoblasten-ähnlichen Zellen mit *S. mutans* und *E. coli* verzeichnet (Engels-Deutsch et al., 2003). Die Genexpression der Cyclooxygenase-2 (Cox-2) war ebenfalls nach Stimulation mit den oben genannten

Bakterien erhöht. Cox-2 ist ein durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren induzierbares Enzym, welches an der Prostaglandin-Biosynthese beteiligt ist. Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α induzieren Cox-2 sowie IL-6 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen (Chang et al., 2003; Lin et al., 2002). Ob die erhöhte Genexpression der Zytokine und von Cox-2 durch bakterielle Bestandteile induziert wird, oder ob diese sekundär durch andere pro-inflammatorische Mediatoren, die von Zellen der Pulpa synthetisiert werden, reguliert wird, sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Der Vergleich der IL-8-mRNA-Expression zwischen mit *E. coli* und *S. mutans* stimulierten Odontoblasten-ähnlichen Zellen zeigte sich eine deutlich erhöhte mRNA-Expression von IL-8 nach Stimulation mit *E. coli*. Wie schon zuvor erwähnt, handelt es sich bei *E. coli* um ein gramnegatives Bakterium, welches auf der äußeren Zellmembran Träger von Lipopolysacchariden ist. Das Endotoxin LPS kann vom Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen erkannt werden, die daraufhin Zytokine freisetzen können. Es ist eine neue Erkenntnis, dass Odontoblasten ebenfalls über TLRs verfügen (Veerayutthwilai et al., 2007). LPS von *E. coli* induzierte die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), die über den Toll-Like-Rezeptor 4 vermittelt wird (Botero et al., 2006). Die Anwesenheit von TLR-4 wurde auf der Oberfläche von Odontoblasten festgestellt (Veerayutthwilai et al., 2007). Der TLR-4 erkennt schon sehr geringe Mengen LPS gramnegativer Bakterien, die somit die Rolle sehr potenter Immun-Aktivatoren einnehmen können (Takeda et al., 2005). In Gingiva-Fibroblastengewebe konnte nach Stimulation mit LPS von *E. coli* eine erhöhte Expression von IL-8 beobachtet werden. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass unter anderem der TLR-4 auf der Oberfläche von Gingiva-Fibroblasten exprimiert wird (Mahanonda et al., 2007). Die erhöhte mRNA Expression von IL-8 nach Stimulation der Odontoblasten-ähnlichen Zellen mit *E. coli* könnte ein weiterer Hinweis auf die TLR-4-Expression auf der Oberfläche von Odontoblasten sein. In einer in-vitro Studie konnte gezeigt werden, dass auf der Odontoblastenoberfläche die Toll-Like-Rezeptoren 1, -6 und -9 exprimiert werden (Durand et al., 2006). Die Studie zeigte weiterhin eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine nach Stimulation der Odontoblasten mit grampositiven Bakterien (Durand et al., 2006). Da grampositive Bakterien wie *S. mutans* unter anderem über den Toll-Like-Rezeptor 2 erkannt werden können, lassen die

gezeigten Ergebnisse TLR-2-vermittelte Prozesse in Odontoblasten vermuten. Als Träger von Toll-Like-Rezeptoren eröffnet sich für die Odontoblasten die Möglichkeit, auf grampositive und gramnegative Bakterien in unterschiedlicher Art und Weise zu reagieren. Damit gewinnen die Odontoblasten deutlich an Bedeutung in Bezug auf mögliche Aufgaben im Rahmen der Immunantwort des Pulpa-Dentin Komplexes.

In früheren Studien wurde festgestellt, dass in der Odontoblastenzellschicht der Zahnpulpa humane β -Defensine-1 und -2 exprimiert werden (Dommisch et al., 2007a und b; Dommisch et al., 2005a). Zurzeit gibt es jedoch keine publizierten Daten über die Genexpression humaner β -Defensine in Odontoblasten-ähnlichen Zellen nach bakterieller Stimulation. In dieser Arbeit konnte nach 240 Minuten eine Erhöhung der mRNA-Expression für hBD-1 und hBD-2 verzeichnet werden. Es gilt nun in weiteren Studien diese Tendenz zu verifizieren, indem man die Expressionsmuster über den Zeitraum von 240 Minuten hinaus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass β -Defensin-2 bakterizid gegen *S. mutans* wirkt (Shiba et al., 2003). Eine solche Wirkung konnte für hBD-1 noch nicht beschrieben werden. Die Stimulation mit *E. coli*, einem nicht kariogenen Bakterium, zeigte keinen Effekt auf die Genexpression von humanen β -Defensinen in Odontoblasten-ähnlichen Zellen. Die Induktion von β -Defensinen durch *S. mutans* könnte ein relevanter Mechanismus im Rahmen der frühen Immunantwort und einer vermutlich daraus resultierenden Entzündungsreaktion darstellen. Die genauen Zusammenhänge gilt es in weiteren Studien zu erforschen.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden Odontoblasten-ähnlichen Zellen mit Bakterienkulturen stimuliert, die für 24h zuvor mit HCl behandelt und anschließend mit NaOH neutralisiert wurden. Zusätzlich wurden weitere Bakterienzellkulturen von *S. mutans* hitzeinaktiviert. Es sollte ein möglicher Unterschied in der Genexpression der Entzündungsmediatoren im Vergleich zur Stimulation mit nativen Bakterienkulturen untersucht werden, um Rückschlüsse auf die Thermo- bzw. Säurestabilität des stimulierenden Agens ziehen zu können. Besonders auffallend war die erhöhte mRNA-Expression für IL-8 bei Odontoblasten-ähnlichen Zellen, nachdem mit HCl- und thermovorbehandelten *S. mutans*-Kulturen stimuliert wurde. Für die anderen untersuchten Gene konnte weder nach der Säure- noch nach der Hitzbehandlung eine Genexpressionsänderung verzeichnet werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten bei

gleichem Versuchsansatz mit entsprechend vorbehandelten *E. coli*-Kulturen dargestellt werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass das auslösende Agens für die Genexpression von IL-8 sowohl säure- als auch hitzestabil war. Da hier jedoch für die Stimulation mit dem grampositiven bzw. gramnegativen Bakterium vergleichbare Ergebnisse demonstriert wurden, können keine genauen Rückschlüsse auf das stimulierende Agens gezogen werden.

Die oralen Epithelien stellen die Grenzfläche zwischen Umwelt und Organismus dar und stehen in einer engen Beziehung zu einer Vielzahl von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten. Die oralen Epithelien bilden nicht nur eine physikalische Barriere aufgrund ihrer zahlreichen Zell–Zell Interaktionen in Form von „Tight Junctions“, Desmosomen und Zonule adherentes, sondern sind vielmehr in der Lage, aktiv auf die bakterielle Besiedelung zu reagieren. Diese Reaktion wird von dem angeborenem Immunsystem übernommen und spiegelt sich in der Expression antimikrobieller Peptide wieder (Dale, 2000; Dale und Krisanaprakornkit, 2001; Schröder, 1999b).

Diese Peptide greifen direkt Mikroorganismen an und haben darüber hinaus auch chemotaktische Eigenschaften, in dem sie eine Verbindung zum spezifischen Immunsystem schaffen und dendritische Zellen, Makrophagen und T–Lymphozyten aktivieren können (Dale, 2003). Die Erkenntnis, dass Odontoblasten ebenfalls antimikrobielle Peptide synthetisieren und somit über Mechanismen des angeborenen Immunsystems verfügen, unterscheidet diese Zellen von anderen Zellen innerhalb der Zahnpulpa und verleiht ihnen Epithel-ähnliche Eigenschaften (Dommisch et al., 2005a; Dale und Krisanaprakornkit, 2001).

Die Stimulation von Gingivaepithelzellen zeigte ein unterschiedliches Genexpressionsmuster nach Stimulation mit *S. mutans* im Vergleich zu *E. coli*. Beide Bakterien induzierten die Expression von den Entzündungsmediatoren Cox-2 und IL-8. Eine erhöhte mRNA Synthese für hBD-1, -2 und IL-6 konnte nur bei der Stimulation mit *S. mutans* gezeigt werden. Wie Studien gezeigt haben, induziert *S. mutans* die Genexpression von IL-8 und IL-6 (Vernier et al., 1996).

In früheren Arbeiten konnten die konstitutive Expression von hBD-1 und die induzierbare Expression von hBD-2 in Gingivaepithelzellen nachgewiesen werden (Ganz & Weiss, 1997; Lehrer, 2004). In-vitro Analysen der Genexpression des humanen β -Defensins-2

in Gingivaepithelzellen zeigten einen Anstieg der mRNA-Synthese als Reaktion auf die Stimulation mit Bakterien oder bakterielle Antigene (Krisanoprakornkit et al., 2002). Untersuchungen an Biopsien der Gingiva zeigten eine erhöhte mRNA-Expression von hBD-2 in der entzündeten Gingiva (Gingivitis) im Vergleich zur gesunden Gingiva und Gingiva von Patienten mit Parodontitis (Dommisch et al., 2005b). Ebenfalls wurde im Rahmen von Untersuchungen mit unterschiedlichen epithelialen Geweben gezeigt, dass die Expression von hBD-2 von dem Grad der Entzündung abhängig ist (Dale, 2000; Ong et al., 2002). Diese Erkenntnisse bestätigen die Aussage, dass die hBD-2 Expression in Gingivaepithelzellen nach bakteriellem Kontakt hochreguliert werden kann (Dommisch et al., 2005b; Krisanoprakornkit et al., 2000). In Anlehnung daran bestätigt diese Arbeit die Erhöhung der Expression für hBD-2 nach Stimulation mit *S. mutans*, ein zwar für die Zahnhartsubstanzen pathogener Keim, der jedoch nicht mit parodontalen Erkrankungen assoziiert wird. Dies steht wiederum im Einklang mit Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass die hBD-2 Expression durch Kommensalen der Mundflora beeinflusst wird, jedoch nicht durch parodontalpathogene Keime (Krisanaprakornkit et al., 2000). Die Stimulierung der Gingivaepithelzellen mit *E. coli* hatte dagegen keinen erkennbaren Einfluss auf die Expression von hBD-2.

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass hBD-1 konstitutiv in Gingivaepithelzellen exprimiert wird und dass eine Stimulierung mit *E. coli* zu keiner Induktion der Expression führt (Krisanaprakornkit et al., 1998). Diese Arbeit bestätigt die fehlende Induktion durch *E. coli*, aber zeigt jedoch eine erhöhte Expression von hBD-1 nach erfolgter Stimulation mit *S. mutans*. Die gezeigten Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass *S. mutans* zur habituellen Flora der Mundhöhle gehört und somit angeborene immunologische Prozesse wirksam werden könnten. Im Gegensatz dazu zählt *E. coli* nicht zur normalen Flora der Mundhöhle und beeinflusst daher möglicherweise nur gering die Expression von Genen des angeborenen Immunsystems in der Mundhöhle.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden Gingivaepithelzellen mit Bakterienkulturen (*E. coli* und *S. mutans*) stimuliert, die für 24h zuvor mit HCl behandelt und anschließend mit NaOH neutralisiert wurden. Zusätzlich wurden weitere Bakterienzellkulturen von *S. mutans* sowie *E. coli* hitzeinaktiviert. Wie bereits für die Odontoblasten-ähnlichen Zellen ausgeführt wurde, sollte der Unterschied in der Genexpression der

Entzündungsmediatoren im Vergleich zur Stimulation mit nativen Bakterienkulturen untersucht werden, um Rückschlüsse auf die Thermo- bzw. Säurestabilität des stimulierenden Agens ziehen zu können. Die Untersuchungen mit säure- und hitzebehandelten *S. mutans*-Kulturen ergaben eine Erniedrigung der Genexpression für IL-8, IL-6 und Cox-2 im Vergleich zur Expression nach Stimulation mit nativen *S. mutans*-Bakterien. Dies lässt darauf schließen, dass das stimulierende Agens für die oben aufgeführten Gene säure- und hitzelabil sein könnte. Die Untersuchungen mit säure- und hitzevorbehandelten *E. coli*-Kulturen zeigten für IL-8 und Cox-2 im Vergleich zur Expression nach Stimulation mit nativen *E. coli*-Bakterien ein ähnliches Ergebnis. Nach Hitzevorbehandlung von *E. coli* konnte im Vergleich keine Veränderung der Expression für IL-8 und Cox-2 gemessen werden. Somit kann der Rückschluss gezogen werden, dass das stimulierende Agens für IL-8 und Cox-2 hitzelabil sein könnte. Die Untersuchung von IL-6 ergab keine Änderung der Genexpression nach Stimulation mit nativen *E. coli*-Kulturen, dagegen jedoch eine Erhöhung der Genexpression von IL-6 nach Stimulation mit säure- und hitzevorbehandelten *E. coli*-Bakterien. Aufgrund dieses gegensätzlichen Ergebnisses konnten keine klaren Rückschlüsse auf mögliche Virulenzfaktoren von *E. coli* bezüglich der Genexpression von IL-6 geschlossen werden.

Diese Arbeit zeigte darüber hinaus eine Ähnlichkeit zwischen dem Expressionsmuster Odontoblasten-ähnlicher Zellen und Gingivaepithelzellen nach Stimulation mit *S. mutans*. In beiden Zelltypen wird die Expression von IL-8, IL-6, Cox-2, hBD-1 und -2 verstärkt. Sowohl in Odontoblasten-ähnlichen Zellen als auch in Gingivaepithelzellen konnten die Zytokine IL-6 und -8 nach Stimulation mit *S. mutans* detektiert werden. Zytokine repräsentieren wichtige Mediatoren, wodurch sie als Regulatoren der Immunabwehr und der Entzündungsreaktion fungieren. Die Cyclooxygenase-2 (Cox-2) ist ein durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren induzierbares Enzym, welches an der Prostaglandin-Biosynthese beteiligt ist. Die Prostaglandine haben ihrerseits pro-inflammatorische und schmerzauslösende Funktionen. Das humane β -Defensin-1 wirkt bakterizid gegen gramnegative Bakterien (Dale et al., 2001; Dunsche et al., 2001; Ganz et al., 1997; Harder et al., 1997; Krisanaprakornkit et al., 1998; Mathews et al., 1999; Sahasrabudhe et al., 2000). Das humane β -Defensin-2 wirkt stark bakterizid

gegen gramnegative Bakterien und *Candida albicans* und hat bakteriostatische Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* (Harder et al., 1997).

Während die Mechanismen des angeborenen Immunsystems für Epithelien seit längerem erforscht werden, sind Untersuchungen zum Verständnis der angeborenen immunologischen Abläufe in Odontoblasten Gegenstand jüngerer Forschungsarbeit. Es sollte die Rolle des angeborenen und des erworbenen Immunsystems für die Gesunderhaltung des Dentin-Pulpa-Komplexes untersucht werden.

Die menschliche Immunantwort setzt sich aus unterschiedlichen Elementen des angeborenen und erworbenen Immunsystems zusammen, die sich dabei gegenseitig regulieren und beeinflussen. Das Immunsystem setzt sich zusammen aus der angeborenen Immunabwehr („innate Immunity“), die in allen mehrzelligen Organismen und Pflanzen zu finden ist und den älteren Teil darstellt und der erworbenen Immunabwehr („adaptive Immunity“), die Pathogene bei erneuter Infektion erkennt und somit ein Selektionsvorteil bietet. Bis heute sind die komplexen Mechanismen der einzelnen Interaktionen zwischen beiden Systemen zum Teil noch unerforscht. Gegenstand verstärkter Forschung war bis jetzt lediglich das erworbene Immunsystem, welches durch seine enorme Spezifität beeindruckt. Es wird durch B- und T-Lymphozyten repräsentiert, die ihre Funktion über Antigen-Antikörper-Reaktionen vermitteln. Der unspezifischen Abwehr gehören neutrophile Granulozyten und Monozyten an, welche zur Phagozytose fähig sind und nach Aktivierung Leukotriene, Thromboxane und Prostaglandine freisetzen können. Des Weiteren zählen zum angeborenen Immunsystem das Komplementsystem und die Wirkung der antimikrobiellen Peptide. Mittels Sekretion von Chemokinen können Monozyten aus Blutgefäßen in das Gewebe übertreten und dort zu Makrophagen differenzieren. Diese Reaktion kann oft schon ausreichen um Infektionen zu verhindern. Ist dies nicht der Fall, sind diese dann in der Lage, Zytokine und vor allem Interleukine zu produzieren, welche wiederum stimulierend auf Lymphozyten wirken. Dies stellt eine Verbindung zwischen dem erworbenen und dem angeborenem Immunsystem dar (Golenhofen, 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Odontoblasten-ähnliche Zellen und Gingivaepithelzellen auf eine ähnliche Art und Weise auf bakterielle Stimulation reagieren. Nicht nur die Zytokine IL-8 und IL-6 werden durch *S. mutans* induziert,

sondern auch die Expression von hBD-1 und -2. Mit der Eigenschaft, β -Defensine konstitutiv und induzierbar zu synthetisieren, zeigen die Odontoblasten-ähnlichen Zellen des Pulpagewebes Epithel-ähnliche Eigenschaften, im Sinne von Attributen der angeborenen Immunabwehr (Dale und Krisanaprakornkit, 2001). Des Weiteren verfügen beide Zelltypen über Toll-Like-Rezeptoren, und sind somit in der Lage, spezifisch auf grampositive und gramnegative Bakterien zu reagieren.

Die Zähne entwickeln sich im Zuge einer wechselseitigen Induktion zwischen dem Ektoderm der Mundhöhle und dem darunterliegenden speziellem Mesenchym, das aus der Neuralleiste entstammt und Ektomesenchym genannt wird (Moll, 2002; Welsch, 2003). Während der Zahnentwicklung senkt sich das orale Epithel ein und bildet, umgeben vom Ektomesenchym, die Zahnknospe. Die Zellen des inneren Schmelzepithels übernehmen später die Amelogenese, während sich der mesenchymale Teil der Zahnknospe unter anderem zu Odontoblasten entwickelt. Diese Entwicklung erfolgt über induktive Prozesse, die von den Knospenepithelzellen ausgehen. Erst nach erfolgter Induktion können die Odontoblasten mit der Dentinogenese beginnen (Schroeder, 1992). Es ist denkbar, dass im Rahmen dieser induktiven Prozesse den ausgereiften Odontoblasten, epithel-ähnliche Eigenschaften verliehen wurden. Dabei geht es primär um die Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Zuge der bakteriellen Abwehr.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte man immunhistologisch die Anwesenheit der TLR-2 und -4 auf der Odontoblastenmembran nachweisen. Nach erfolgter Stimulation mit *E. coli*-Lipopolysacchariden konnte man eine erhöhte Expression für IL-8 beobachten. Da LPS ein Ligand für den TLR-4 darstellt, macht man seine Aktivierung für die erhöhte Expression verantwortlich (Veerayutthwilai et al., 2007). Diese Arbeit bestätigt diese Erkenntnis, denn der Stimulierung der Odontoblasten-ähnlichen Zellen mit *E. coli* folgt eine erhöhte mRNA Expression von IL-8. Die unterschiedliche Genexpression von hBD-1, hBD-2, IL-8 und IL-6 in Odontoblasten nach Stimulierung mit *S. mutans* und *E. coli* zeigt, dass diese Zellen im Stande sind, auf grampositive und gramnegative Bakterien in einer unterschiedlichen Art und Weise zu reagieren. Dieses Reaktionsvermögen spiegelt sich wider in der Regulation pro-inflammatorischer Zytokine, die entscheidend für die Ausbildung einer akuten oder chronischen Entzündung sein könnten. Welche Rolle dabei die Toll-like-Rezeptoren, als Bestandteil

des angeborenen Immunsystems spielen, soll Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeit sein. Es sind Zusammenhänge beobachtet worden, welche eine vermutlich überschießende, bakteriell verursachte Immunreaktionen mit resultierenden irreversiblen Pulpitiden und periradikulären entzündlichen Prozessen in Verbindung bringen (Hellwig et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten, bezüglich des Einflusses von *S. mutans* auf die Genexpression relevanter Entzündungsmediatoren, wie z.B. IL-8 und IL-6 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen immunreaktives Verhalten demonstrieren. Es ist eine Annahme, dass Odontoblasten, welche vermutlich als erste Zellen des Dentin-Pulpa-Komplexes in Interaktion mit Bakterien und bakteriellen Stoffwechselprodukten treten, eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr besitzen, und entsprechende immunologische Reaktionen dieser Zellen entscheidend für den weiteren Verlauf des Entzündungsgeschehens sein könnten.

Ergebnisse aus einer kürzlich publizierten Arbeit aus dem Labor der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Bonn zeigten, dass die Expression von hBD-1 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen scheinbar nicht rein konstitutiv, sondern regulierbar war (Dommisch et al., 2007a). Die Stimulation Odontoblasten-ähnlicher Zellen mit rekombinant hergestelltem hBD-2 (rhBD-2) führte zu einer Erniedrigung der Expression von hBD-1. Mit zunehmender Konzentration von rhBD-2 kehrte die mRNA-Expression von hBD-1 auf den Ausgangswert zurück. Somit zeigte sich eine Korrelation zwischen hBD-1 und -2 im Sinne einer induktiven Funktion des hBD-2 auf die mRNA Expression von hBD-1. Die Stimulation Odontoblasten-ähnlicher Zellen mit *S. mutans* zeigte eine erhöhte mRNA-Expression sowohl für hBD-1 als auch für hBD-2. Die Stimulation mit *E. coli* ergab dagegen keine Änderung in der mRNA Expression der untersuchten Gene.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit stimulierende Effekte auf die Genexpression humaner β -Defensine und pro-inflammatorischer Mediatoren in Odontoblasten-ähnlichen Zellen und Gingivaepithelzellen als Antwort auf die Bakterien *S. mutans* und *E. coli* zeigen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des humanen β -Defensin-2 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen durch

bakterielle Stimulation induzierbar ist. Eine erhöhte Genexpression von hBD-2 durch den Einfluss von *S. mutans* könnte im Rahmen einer frühen, angeborenen Immunantwort Odontoblasten-ähnlicher Zellen eine bedeutende Rolle spielen. Als Antwort auf die Stimulation mit *S. mutans* und *E. coli* zeigten beide Zelltypen ähnliche Expressionsmuster von Genen pro-inflammatorischer Mediatoren. Unterschiede ließen sich für die Bakterien untereinander darstellen, wobei *S. mutans* als oralpathogenes Bakterium insgesamt deutlichere Effekte auf die Expression der untersuchten Gene im Vergleich zu *E. coli* bewirkte. Toll-like-Rezeptoren könnten hier an der Vermittlung transduktorischer Signale grampositiver (*S. mutans*) bzw. gramnegativer Bakterien (*E. coli*) einen entscheidenden Beitrag leisten.

5. Zusammenfassung

Die Gewebe der Mundhöhle werden von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt. Während das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunabwehr in Gingivaepithelzellen seit längerem untersucht wird, ist es eine neuere Erkenntnis, dass Odontoblasten neben pro-inflammatorischen Mediatoren auch antimikrobielle Peptide wie humane β -Defensine synthetisieren. Ziel dieser Arbeit war es, das Expressionsverhalten von Genen des angeborenen Immunsystems und pro-inflammatorischer Mediatoren in humanen Odontoblasten-ähnlichen Zellen und Gingivaepithelzellen nach bakterieller Stimulation zu untersuchen.

Kulturen humaner Odontoblasten-ähnlicher Zellen und Gingivaepithelzellen wurden mit *Streptococcus mutans* und *Escherichia coli* über einen Zeitraum von 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten stimuliert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und die cDNA-Synthese (oligo-(dT)-Primern) durchgeführt. Die quantitative Auswertung der Genexpression der humanen β -Defensine (hBD-1, -2), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Cyclooxygenase-2 (Cox-2), Dentinsialophosphoprotein (DSPP) und β -Aktin (als Housekeeping-Gen) wurde mit Hilfe der Real-Time PCR vorgenommen.

Die Stimulation mit *S. mutans* führte sowohl in Odontoblasten-ähnlichen Zellen als auch bei Gingivaepithelzellen zu einer Erhöhung der Genexpression von hBD-1 und hBD-2. Die Genexpression pro-inflammatorischer Mediatoren (IL-6, IL-8) und von Cox-2 war in beiden Zelltypen erhöht, wobei in Gingivaepithelzellen deutlichere Effekte nach der *S. mutans* Stimulation im Vergleich zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen gezeigt werden konnten. Die Stimulation mit *E. coli* bewirkte eine Erhöhung der Genexpression von IL-6, IL-8 und Cox-2 in Odontoblasten-ähnlichen Zellen bzw. von IL-8 und Cox-2 in Gingivaepithelzellen. Die Genexpression von hBD-1 und -2 wurde durch die Stimulation mit *E. coli* nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass Odontoblasten und Gingivaepithelzellen aktiv an lokalen, angeborenen immunologischen Reaktionen, spezifisch für grampositive und gramnegative Bakterien, beteiligt sind.

6.Literaturverzeichnis

Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yojota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 783-836

Bals R. Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika. *Medizinische Klinik* 2000; 95: 496–502

Beighton D, Manji F, Baelum V, Fejerskov O, Johnson NW, Wilton JM. Associations between salivary levels of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacilli* and caries experience in Kenyan adolescents. *J Dent Res* 1989; 68: 1242-1246

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. HBD-1: a novel β -defensin from human plasma. *FEBS Letters* 1995; 368: 331-335

Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, Hanks CT, Nor JE. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. *J Endod* 2006; 32: 951-955

Buischi YA, Axelsson P, Barbosa M, Nayer MP, Prado MC. Salivary *Streptococcus mutans* and caries prevalence in Brazilian schoolchildren. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1989; 17: 28-30

Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29: 23-39

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-193

Carlsson P, Olsson B, Bratthal D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries. *Arch Oral Biol* 1985; 30: 265-268

Chang YC, Huang FM, Yang SF, Liu CM, Lai CC, Chan Y, Hsieh YS.

Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human pulp cells stimulated with black-pigmented bacteroides. J Endod 2003; 29: 240-243

Dale BA. Fascination with epithelia: architecture, proteins, and functions. J Dent Res 2003; 82: 866-869

Dale BA, Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. J Oral Pathol Med 2001; 30: 321-327

Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. Periodontol 2000; 30: 70-78

Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W, Karlsons. Biochemie und Pathobiochemie. Stuttgart-New York: Georg Thieme, 2005

Dommisch H, Winter J, Willebrand C, Eberhard J, Jepsen S. Immune regulatory functions of human β -defensin-2 in odontoblast-like cells. Int Endod J 2007a; 40: 300-307

Dommisch H, Winter J, Hacker J, Mintcheva M, Eberhard J, Götz W, Jepsen S. Differential gene expression of interleukin-6, -8, cyclooxygenase-2, and human beta-defensins in dental pulp. Advances Dent Res; in print, 2007b

Dommisch H, Whasun OC, Maryam GR, Williams D, Rangarajan M, Curtis MA, Dale BA. Protease-Activated Receptor 2 Mediates Human Beta-Defensin 2 and CC Chemokine Ligand 20 mRNA Expression in Response to Proteases Secreted by *Porphyromonas gingivalis*. Infection and Immunity 2007c; 75: 4326-4333

Dommisch H, Winter J, Açil Y, Dunsche A, Tiemann M, Jepsen S. Human β -defensin (hBD-1, -2) expression in dental pulp. Oral Microbiol Immunol 2005a; 20: 163-166

Dommisch H, Ail Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human β -defensins (hBD-1, -2,-3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005b; 20: 186-190

Donkersloot JA, Hoerman KC. Letter: *S. mutans* and caries. *J Am Dent Assoc* 1974; 88: 466-467

Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schröder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 121-124

Dunsche A, Acil Y, Siebert R, Harder J, Schröder JM, Jepsen S. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 154-158

Durand SH, Flacher V, Roméas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, Magloire H, Couble ML, Bleicher F, Staquet MJ, Lebecque S, Farges JC. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol* 2006; 176: 2880-2887

Eberhard J, Zahl A, Dommisch H, Winter J, Jepsen S. Heat shock induces the synthesis of the proinflammatory mediator leukotriene B4 in human pulp cells. *Int Endod J* 2005; 38: 882-888

Eisenberg AD, Mundorff SA, Featherstone JDB, Leverett DH, Adair SM, Billings RJ, Proskin HM. Association of microbial factors and plaque index with caries prevalence and water fluoridation status. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 139-145

Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y, Shibata Y, Haikel Y, Scholler-Guinard M, Klein JP. Insertional inactivation of *pac* and *rmlB* genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, Interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. *Infect Immun* 2003; 71: 5169-5177

Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J Am Dent Assoc 1960; 61: 9-19

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol 2003; 3: 710-720

Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. Semin Hematol 1997; 34: 343-354

Golenhofen K. Basislehrbuch Physiologie. München: Urban&Fischer, 2004

Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Heidelberg: Springer Medizin, 2005

Hahn CL, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by Streptococcus mutans und pulpa pathogenesis. Infect Immun 2000; 68: 6785-6788

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. Isolation and characterization of human beta defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem 2001; 276: 5707-5713

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. Nature 1997; 387: 861

Heidemann D. Kariologie und Füllungstherapie. München-Wien-Baltimore: Urban&Schwarzenberg, 1999

Hellden L, Salonen L, Gustafsson I. Oral health in an adult Swedish population. Prevalence of teeth, removable dentures and occlusal supporting zones. Swed Dent J 1989; 13: 45-60

Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. München-Jena: Urban&Fischer, 2003

Hill CP, Yee J, Selsted ME, Eisenberg D. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science* 1991; 251: 1481-1486

Hirsch C. Kommerzielle Speicheltests zur Kariesrisikobestimmung bei Kindern und Jugendlichen. *ZMK* 1999; 12: 786

Hornet MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2002; 3: 1033–1040

Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson GH. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: A novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 2001; 7: 180-185

Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Sakai H. Immunohistochemical study on the immunocomplement cells of the pulp in human non- carious and carious teeth. *Arch Oral Biol* 1995; 40: 609-614

Jeneway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216

Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 179-200

Ke LD, Chen Z, Yung WK. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Mol Cell Probes* 2000; 14: 127-135

Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA. Regulation of human beta-defensin 2 in gingival epithelial cells. The involvement of mitogen –activated protein kinase pathways, but not the kB transkription factor family. *J Immunol* 2002; 168: 316-324

Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 2000; 68: 2907-2915

Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human β -defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 1998; 66: 4222-4228

Kristoffersson K, Axelsson P, Birkhed D, Bratthal D. Caries prevalence, salivary *Streptococcus mutans* and dietary habits in 13-year-old Swedish school children. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1986; 14: 202-205

Kristoffersson K, Göhndahl HG, Bratthal D. The more *Streptococcus mutans*, the more caries on approximal surfaces. *J Dent Res* 1985; 64: 58-61

Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 727-738

Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 23-27

Lin SK, Kuo MY, Wang JS, Lee JJ, Wang CC, Huang S, Shun CT, Hong CY. Differential regulation of interleukin-6 and inducible cyclooxygenase gene expression by cytokines through prostaglandine-dependent and –independent mechanisms in human dental pulp fibroblasts. *J Endod* 2002; 28: 197-201

Loesche WJ. Dental Caries. A Treatable Infection. Springfield, Illinois: The University of Michigan School of Dentistry, 1982

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microb Rev* 1986; 50: 353-380

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie und Pathobiochemie. Heidelberg. Springer Medizin, 2007

MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem* 1997; 272: 835-842

Madigen TM, Martinko JM. *Brock Mikrobiologie*. München: Pearson-Studium, 2006

Mahanonda R, Sa-Ard-lam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichit K, Fukuda MM, Pichyangkul S. IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol* 2007; 178: 1151-1157

Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB Jr. Production of β -defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 1999; 67: 2740-2745

Moll KJ, Moll M. *Anatomie*. München-Jena: Urban&Fischer, 2002

Narayanan K, Gajjaraman S, Ramachandran A, Hao J, George A. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J Biol Chem* 2006; 281: 19064-19071

Näveke R, Trepper KP. *Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden*. Stuttgart-New York: Fischer, 1979

Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 277-304

Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. Antimicrobial peptides human β -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 594-604

Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human β -defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumor necrosis factor- α -treated human neutrophils. *Immunol* 2004; 111: 273-281

Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002; 374: 1151-1160

Orland FJ, Blaney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res* 1954; 33: 147-174

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 2001; 29: 2002-2007

Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK. Pathologie für Zahnmediziner. München-Jena: Urban&Fischer, 2004

Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A, Dale BA. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *J Dent Res* 2000; 79: 1669-1674

Salonen L, Allander L, Brattahl D, Togelius J, Hellden L. Oral health status in an adult Swedish population. Prevalence of caries. *Swed Dent J* 1989; 13: 111-123

Schlegel HG. Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart-New York. Georg Thieme Verlag, 1992

Schröder JM, Harder J. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 469–486

Schröder JM. Antimikrobielle Peptide - Antibiotika der Zukunft? *Med Monatsschr Pharm* 1999a; 22: 270-276

Schröder JM. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol* 1999b; 57: 121-134

Schröder JM, Harder J. Human β -defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 1999c; 31: 645-651

Schroeder HE. *Orale Strukturbioologie*. Stuttgart-New York: Thieme Verlag, 1992

Shiba H, Mouri Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Takeda K, Sugai M, Kinane DF, Kurihara H. Macrophage inflammatory protein-3 α and beta-defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 867-871

Takahashi A, Wada A, Ogushi K, Maeda K, Kawahara T, Mawatari K, Kurazono H, Moss J, Hirayama T, Nakaya Y. Production of beta-defensin-2 by human clonic epithelial cells induced by *Salmonella enteridis* flagella filament structural protein. *FEBS Lett* 2001; 508: 484-488

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999; 75: 291-295

Tjäderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M, Overall CM. A novel organ culture method to study the function of human odontoblasts in vitro: gelatinase expression by odontoblasts is differentially regulated by TGF- β 1. *J Dent Res* 1998; 77: 1486-1496

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by genomic averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: Research 0034

Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham T-TT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 5-13

- Vernier A, Diab M, Soell M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Wachmann D, Klein JP. Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to oral viridans streptococci involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors. *Infect Immun* 1996; 64: 3016-3022
- Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nature Clin Pract* 2005; 2: 406–415
- Welsch U. Sobotta Lehrbuch Histologie. München-Jena: Urban & Fischer, 2003
- Wilkie BN, Mallard B. Selection for high immune responses: an alternative approach to animal health maintenance? *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72: 231-235
- Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract native T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 9-14
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525-528
- Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 2002; 23: 291-296

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. S. Jepsen, M.S., Direktor der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung des Themas und der finanziellen Mittel zur Durchführung aller Experimente,

Herrn Dr. J. Winter, Diplombiologe und Leiter des zell- und molekularbiologischen Labors der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, gilt mein Dank für die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der zell- und mikrobiologischen Experimente,

Herrn Dr. H. Dommisch, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel über das BONFOR Förderungsprogramm und für die Beratung bei der Abfassung der Arbeit,

Frau M. Schulte, medizinisch-technische Assistentin der Universität Bonn, gilt mein Dank für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der zell- und molekularbiologischen Versuche,

und Frau Dr. C. Willebrand, wissenschaftliche Mitarbeiterin der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für ihre Hilfe bei der Darstellung der Graphen.

Publikationen

- 2007 Dommisch H, Winter J, Hacker J, Mintcheva M, Eberhard
J, Götz W, Jepsen S. Differential gene expression of interleukin-6,
-8, cyclooxygenase-2, and human beta-defensins in dental pulp.
Advances Dent Res; in print